บทที่ 2

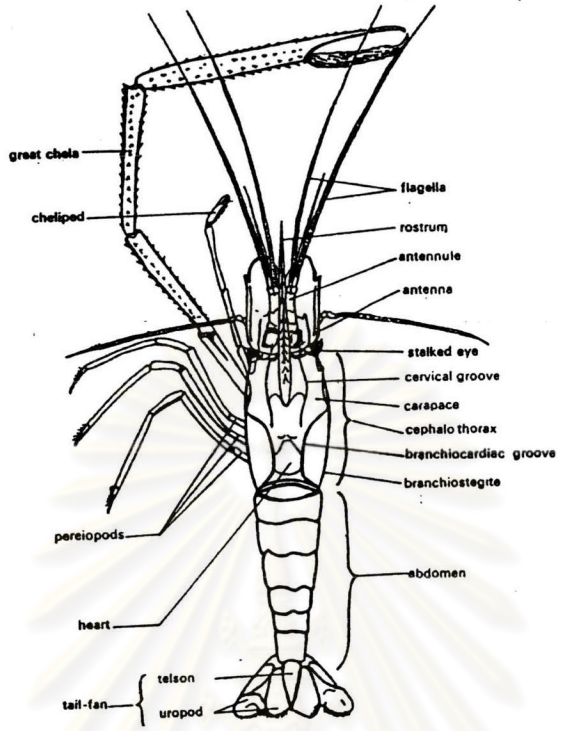
วารสารปริทัศน์

2.1 กุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปในแต่ละท้องถิ่น บางแห่งเรียกว่า กุ้งนาง กุ้งหลวง หรือกุ้งใหญ่ อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดตามแม่น้ำต่างๆ ที่ไหลลงสู่ทะเล (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2526) มีชื่อทางวิทยาศาตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii* De Man ชื่อสามัญเรียกว่า Giant freshwater prawn

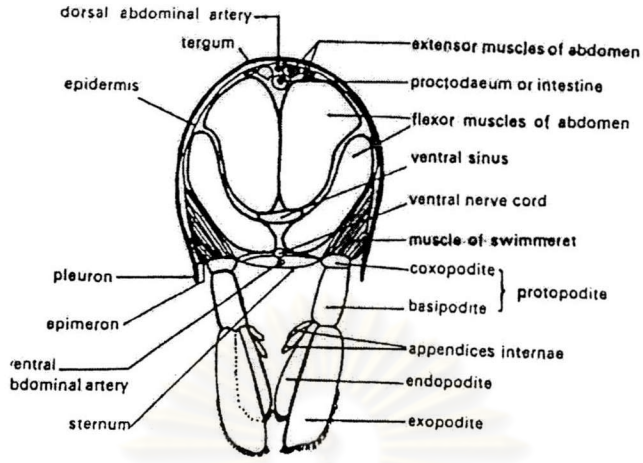
กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลังจัดอยู่ใน Phylum Atropoda, Class Crustacean, Family Palaemonidae เป็นสัตว์น้ำที่มีเปลือกหุ้มเป็นโครงร่างอยู่ภายนอก (exoskeleton) ร่างกายของกุ้งประกอบด้วยส่วนหัวที่เชื่อมรวมกับทรวงอก (cephalothorax) และส่วนท้อง (abdomen) เปลือกหุ้มลำตัวมีคิวติเคิล (cuticle) เป็นสารไคติน (chitin) ที่ผลิตจากเซลล์ผิวหนังเป็นโครงค้ำจุนภายนอกเปลือกหุ้มแบ่งออกเป็น 3 ชั้นคือ ชั้นนอกสุดเป็นชั้นผิวเคลือบมัน ชั้นกลางเป็นโครงสร้างที่ให้ความแข็งแรง และชั้นในสุดติดกับเซลล์ผิวและมีความยืดหยุ่นได้ ลำตัวกุ้งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังรูป 2.1 คือ ส่วนหัว ส่วนลำตัว และส่วนหาง ส่วนหัวประกอบด้วยขาเดิน 3 คู่และขาที่มีลักษณะเป็นก้ามอีก 2 คู่อยู่ทางส่วนหน้า ขาคู่ที่ 1 ใช้ในการป้อนอาหารเข้าปากและทำความสะอาดร่างกาย ขาคู่ที่ 2 ใช้ประโยชน์ในการต่อสู้และจับเหยื่อ ส่วนปลายสุดของกุ้งก้ามกรามประกอบด้วยกรี ที่สันกรีด้านบนและล่างมีหลักหนามคล้ายฟันเลื่อย ส่วนลำตัวแบ่งออกเป็นปล้องๆ รวม 6 ปล้อง ส่วนหางประกอบด้วยแพนหางข้างละ 1 คู่ ตรงส่วนกลางเป็นปลายหางแหลม (อารีย์ สิทธิมังค์, 2532)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)
ที่มา ; คลุ้ม วัชโรบล (2518)

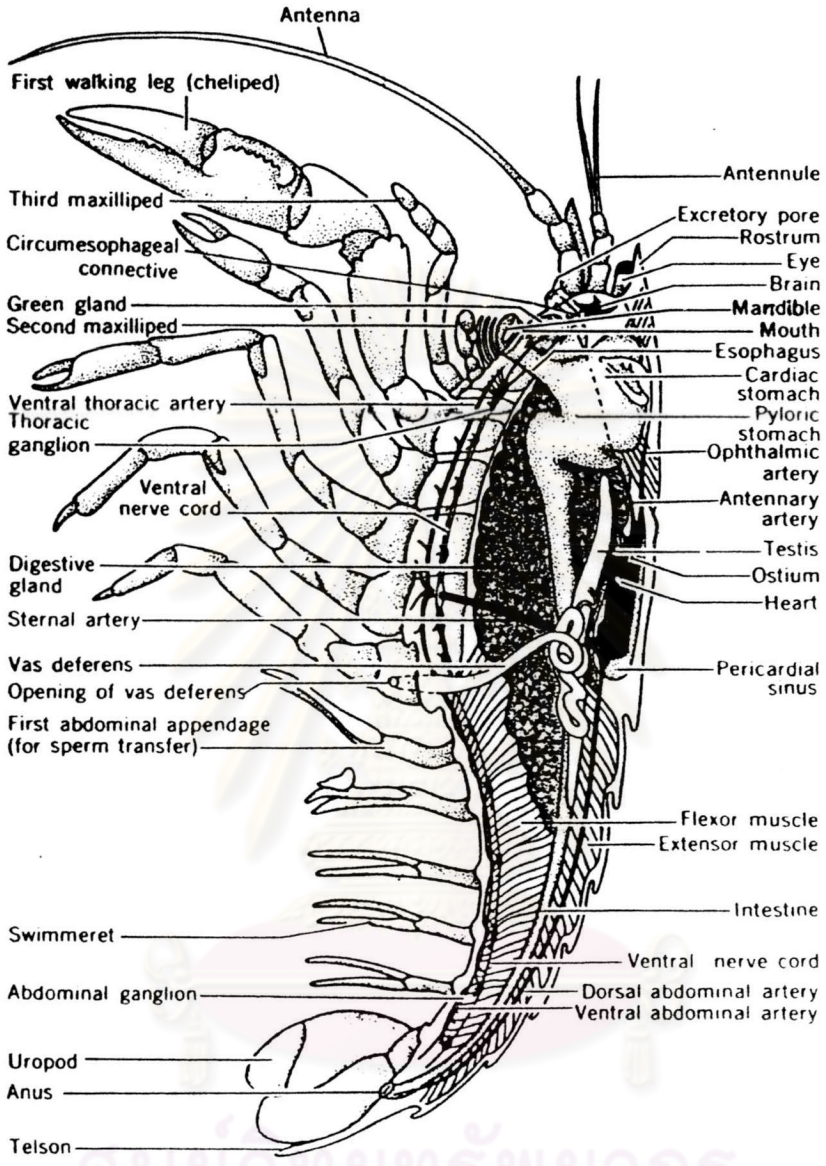
เปลือกหุ้มลำตัวของกุ้งมีคิวติเคิลหนาปกคลุมอยู่ 2 ชั้นคือ ชั้นนอกประกอบด้วยสารไลโพโปรตีนบางๆ และชั้นในมีแคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมฟอสเฟต และสารประกอบไคติน (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2526) เซลล์ที่จัดเรียงตัวชั้นนอกสุดคือชั้นอิพิเดอมีส ถัดลงไปเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีโครมาโตฟอร์แทรกอยู่ และมีกล้ามเนื้อตามยาวส่วนใหญ่ ยกเว้นกล้ามเนื้อบุรอบหัวใจและเส้นเลือดซึ่งเป็นกล้ามเนื้อตามขวาง หน้าที่ของกล้ามเนื้อ คือ การยืดระยางค์ให้เคลื่อนไหว ซึ่งประกอบด้วยกล้ามเนื้อเฟลคเซอร์ (flexor muscle) มีอยู่ 2 คู่ เป็นมัดกล้ามเนื้อที่เรารับประทานเป็นส่วนใหญ่โดยทำหน้าที่ช่วยในการดีดตัวของกุ้ง และกล้ามเนื้อเอคเทนเซอร์ (extensor muscle) มีอยู่ 2 คู่ เป็นมัดกล้ามเนื้อที่ช่วยให้กุ้งเหยียดตัว (คลุ้ม วัชโรบล, 2518) ดังแสดงในรูป 2.2



รูปที่ 2.2 ภาพผ่าตามขวางส่วนท้องปล้องที่ 2 ของกุ้งก้ามกราม
ที่มา ; คลุ้ม วัชโรบล (2518)

โดยทั่วไปกุ้งจะมีอวัยวะย่อยอาหารอยู่บริเวณส่วนหัว (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2526; คลุ้ม วัชโรบล, 2518) สำหรับทางเดินอาหารของกุ้งเริ่มจากปากที่มีขากรรไกรลงสู่ลำคอและกระเพาะ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ กระเพาะส่วนแรก (cardiac stomach) และกระเพาะส่วนหลัง (pyloric stomach) ระหว่างกระเพาะทั้งสองตอนมีแกสตริคมิลล์ (gastric mill) ที่เป็นอวัยวะใช้บดอาหารให้มีขนาดเล็กลงเพื่อให้ง่ายต่อการย่อยด้วยกระบวนการทางเคมี โดยบริเวณด้านข้างทั้งสองข้างของกระเพาะส่วนหลังจะมีรูเปิดของท่อน้ำดีจากต่อมผลิตน้ำย่อย (digestive gland) เพื่อส่งน้ำย่อยชนิดต่างๆเข้ามาย่อยจนได้สารโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถดูดซึมเข้าไปใช้ในร่างกาย ส่วนกากที่เหลือจะส่งผ่านไปยังลำไส้เล็กที่ยื่นยาวออกไปในช่องท้อง และมีรูเปิดออกนอกร่างกายบริเวณโคนหาง (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2526; Boolootian, 1976) ดังแสดงในรูปที่ 2.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 โครงสร้างภายในของกุ้งก้ามกราม

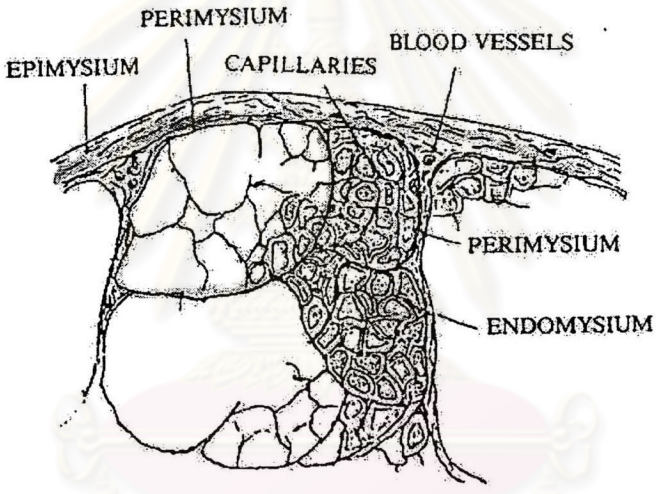
ที่มา: Boolootian (1976)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 องค์ประกอบของกล้ามเนื้อ

2.2.1 เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue)

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันทำหน้าที่ห่อหุ้มมัดกล้ามเนื้อ (muscle bundle) และเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle cell) ให้อยู่รวมกัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่หุ้มโปรตีนกล้ามเนื้อประกอบด้วย เอนโดไมเซียม (endomysium) เป็นชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ห่อหุ้มเส้นใยกล้ามเนื้อ เพอริไมเซียม (perimysium) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบๆ มัดกล้ามเนื้อและห่อหุ้มมัดกล้ามเนื้อ และอิพิไมเซียม (epimysium) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบๆ กล้ามเนื้อโครงร่างและห่อหุ้มมัดกล้ามเนื้อหลายๆ มัด ให้อยู่รวมกันเป็นมัดกล้ามเนื้อโครงร่าง (Ham, 1969; Pearson and Young, 1989) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 และ 2.5



รูปที่ 2.4 เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อสัตว์
ที่มา : Ham (1969)

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นสารประกอบพวกโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีปริมาณมาก คือ คอลลาเจน ซึ่งประกอบด้วยสารไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคสปนอยู่เล็กน้อย และมีปริมาณกรดอะมิโนไกลซิน (glycine) สูงเกือบเป็นหนึ่งในสามของกรดอะมิโนทั้งหมดที่มีอยู่ในคอลลาเจน เส้นใยคอลลาเจนจะช่วยทำให้โครงสร้างกล้ามเนื้อมีความแข็งแรง (Ham, 1969; Pearson and Young, 1989)

2.2.2 โปรตีนกล้ามเนื้อ (muscle protein)

โปรตีนกล้ามเนื้อประกอบด้วยมัดกล้ามเนื้อที่มีขนาด และความหนาแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของกล้ามเนื้อนั้นๆ และปริมาณมัดกล้ามเนื้อที่ประกอบอยู่ มัดกล้ามเนื้อประกอบด้วยเซลล์เส้นใยกล้ามเนื้อจำนวนมากที่ถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเอนโดไมเซียม เยื่อหุ้มเซลล์เส้นใยกล้ามเนื้อจะยืดหยุ่นได้ดีเรียกว่า ซาร์โคเลมมา (sarcolemma) ช่วยยึดเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrils) ให้อยู่รวมกัน ภายในเซลล์กล้ามเนื้อมีสารที่มีลักษณะหนืด เรียกว่า ซาร์โคพลาสม (sarcoplasm) (Ham, 1969)

เซลล์กล้ามเนื้อถูกจัดเรียงแบบขนานตามความยาว เพื่อรวมตัวกันเป็นมัดกล้ามเนื้อ (muscle bundle) เซลล์กล้ามเนื้อยังประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ เรียงตัวกันอย่างอัดแน่นและล้อมรอบด้วยของเหลวต่างๆ และซาร์โคพลาสม ได้แก่ ไลโซโซม (lysosome) ไกลโคเจน (glycogen) และเอนไซม์ต่างๆ (Ham, 1969) เส้นใยกล้ามเนื้อมีเส้นใยหนาไมโอซิน (myosin) และบางแอคติน (actin) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 เรียงตัวสลับกันไปตลอดความยาวของเส้นใย ทำให้เห็นเป็นลายของกล้ามเนื้อและเรียกว่า กล้ามเนื้อลาย (striated muscle) (Pearson and Young, 1989; Edwards, 1995; Alberts et al., 2002)

2.3 โครงสร้างต่ำกว่าระดับจุลภาคของโปรตีนกล้ามเนื้อ

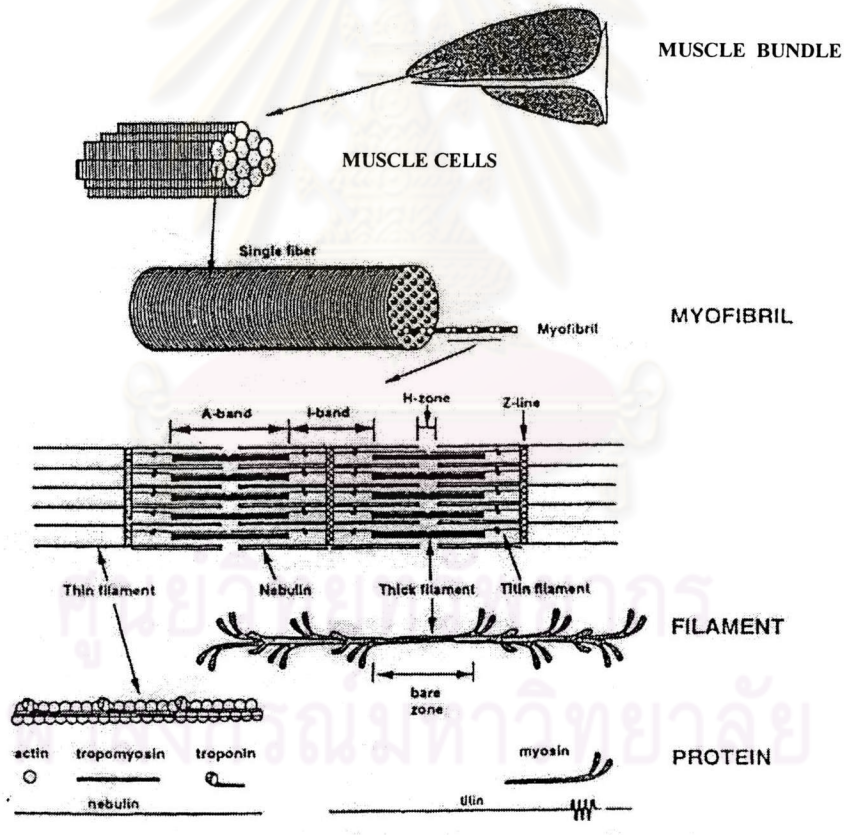
กล้ามเนื้อโครงร่างของกุ้งเป็นกล้ามเนื้อลาย (อนุตรา อัครจามร, 2534; Shigueno, 1975) ลักษณะลายกล้ามเนื้อที่เห็น เป็นผลมาจากการเรียงตัวของเส้นใยย่อยไมโอซินและแอคตินอย่างเป็นระเบียบ เส้นใยย่อยอาจมีจำนวนมากถึง 1,000 เส้นต่อ 1 เซลล์กล้ามเนื้อ และถูกล้อมรอบด้วยไซโตพลาสม นิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อพบตามผิวนอกและมีจำนวนมาก ส่วนไมโตคอนเดรีย (mitochondria) พบอยู่ในระหว่างเส้นใยย่อยและทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้ยังพบซาร์โคพลาสมิกเรคติคิวลัม (sarcoplasmic reticulum) และ ทรานเวอสทิวบูลา (transverse tubular system) อยู่เป็นระยะๆ ในเส้นใยกล้ามเนื้อ (Ham, 1969)

ซาร์โคเลมมา (sarcolemma) หรือบางครั้งเรียกว่าเยื่อหุ้มเซลล์ หมายถึง เยื่อบางๆ ที่ห่อหุ้มรอบเซลล์กล้ามเนื้อ และถัดออกมาจากเยื่อหุ้มเส้นใย คือ เอนโดไมเซียมเป็นเยื่อเกี่ยวพันหุ้มเส้นใยที่มีคุณสมบัติยืดหยุ่นได้ดี

ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) มีรูปร่างเป็นแท่งรูปวงรี และอาจมีขนาดต่างๆ กัน พบในที่ว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อใต้เยื่อหุ้มเซลล์และมักอยู่ตามบริเวณใกล้เส้น (Z-line) ไมโตคอนเดรียทำหน้าที่ในการเก็บรักษาพลังงานจากอาหารผ่านทาง Kreb's cycle แล้วจึงแปรสภาพไปเป็นพลังงาน ATP โดยกระบวนการ phosphorylation ภายในไมโตคอนเดรียจะมีเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการเมตาบอไลซ์ pyruvate และ fatty acid (Wolfe, 1993; Alberts et al., 2002)

ไลโซโซม (lysosome) มีรูปร่างเหมือนถุงเล็กๆ ที่ภายในมีเอนไซม์หลายชนิดๆ รวมทั้งกลุ่มเอนไซม์คาเทปซิน (cathepsins) ซึ่งมีความสามารถในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (Wolfe, 1993; Alberts et al., 2002)

เส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibril) หมายถึงเส้นใยโปรตีนไมโอซินและแอคติน ที่จัดเรียงกันอย่างหนาแน่นและเป็นระเบียบ โดยทำหน้าที่เป็นโครงสร้างและเกี่ยวข้องกับการยืดหดตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะเห็นเป็นลายของกล้ามเนื้อ (Greaser,1997; Kijowski, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 กล้ามเนื้อโครงร่าง

ที่มา : Greaser (1997)

แถบบาง (light band) ของเซลล์กล้ามเนื้อ ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อแอคตินซึ่งเป็นโปรตีนแอคติน แอคตินจะเรียงตัวกันเป็นแถบสีจางเรียกว่า I-band ส่วนแถบหนา (dark band) ของเซลล์กล้ามเนื้อประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อไมโอซินและแอคตินเรียงซ้อนสลับกันอยู่ แถบหนานี้จะเรียกว่า A-band และในแถบ A-band จะมีส่วนที่โปร่งแสงอยู่ตรงกลาง เรียกว่า H-zone เส้นใยโปรตีนไมโอซินและแอคตินจะเรียงตัวขนานกันตามความยาวของเส้นใยฝอย โดยที่ปลายของเส้นใยโปรตีนแอคตินจะยึดติดกับเส้น Z-line ซึ่งอยู่ที่กึ่งกลางของ A-band ช่วงความยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อจาก Z-line หนึ่งไปยังอีก Z-line หนึ่ง เรียกว่า หน่วยกล้ามเนื้อซาร์โคเมียร์ (sarcomere) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของกล้ามเนื้อที่มีบทบาทสำคัญในการหดตัว (contraction) และการคลายตัวหรือยืดตัว (relaxation) (Ham, 1969; Pearson and Young, 1989; Kijowski, 2001)

2.4 เส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber)

เส้นใยกล้ามเนื้อหรือบางครั้งอาจเรียกว่า myofibrillar protein ทำหน้าที่เป็นเส้นใยโครงสร้างของกล้ามเนื้อ และเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีปริมาณมาก โดยมีปริมาณถึง 55-60% ของโปรตีนกล้ามเนื้อ (Hultin, 1985; Pearson and Young, 1989) องค์ประกอบส่วนใหญ่ของ myofibrillar protein คือกลุ่มโปรตีนที่สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือที่มีค่า ionic strength มากกว่า 0.6 การแบ่งกลุ่มโปรตีนในกล้ามเนื้อโดยใช้คุณสมบัติทางกายภาพและโครงสร้างสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Pearson and Young, 1989; Kijowski, 2001) ได้แก่ โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ โปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อและควบคุมเส้นใยโปรตีนให้อยู่ในตำแหน่งภายในซาร์โคเมียร์ และโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดจับหรือเชื่อมโยงเส้นใยโปรตีนให้อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง โปรตีนแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 แสดงโปรตีนบางส่วนที่มีอยู่ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยคิดเป็นร้อยละของ myofibrillar protein

Protein	Quantitative (%)	Location in sarcomere	Major function
Contractile proteins			
Myosin	50	A-band thick filaments	Contraction
Actin	20	Thin filaments	Contraction
Regulartory proteins			
Tropomyosin	3	Thin filaments	Regulates contraction
Troponin	4.5	Thin filaments	Regulates contraction
α- actinin	1	Z-disk	Cements thin filament to Z-filament in Z-disk
β-actinin	< 0.1	A-band end of thin filaments	Regulates length of thin filaments
Eu-actinin	0.3	Z-disk	Polymerization, interact with actin and α- actinin to contribute to Z-disk density
Cytoskeletal proteins			
Titin (connectin)	5-8	Throughout sarcomere	Holds thick filaments in lateral register
Nebulin	3	I-band	Binds titin in lateral register
Desmin	< 0.2	Z-disk	Transversely links myofibrils in Z-disk
Filamin	0.1	Z-disk	Transversely links myofibrils in Z-disk
X-protein	0.2	Z-disk	Binds Z-disk filaments

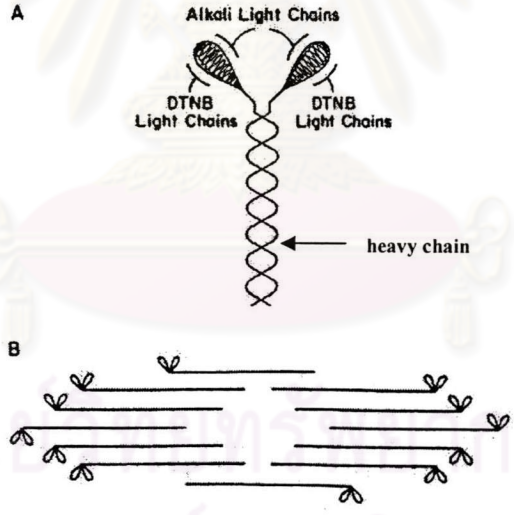
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Pearson and Young (1989)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.1 โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ (contractile proteins)

โปรตีนที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ โปรตีนไมโอซินและแอคติน ทำหน้าที่ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อและเป็นโครงสร้างของโปรตีนกล้ามเนื้อ

หลังจากสกัดโปรตีนที่สามารถละลายน้ำออกไปก่อนแล้ว โปรตีนไมโอซินสามารถสกัดจากโปรตีนกล้ามเนื้อได้ด้วยสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นมากกว่า 0.15 mol/L ไมโอซินเป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่โดยอาจมีน้ำหนักโมเลกุลถึง 500 kDa และมีปริมาณมากประมาณ 50 % ของ myofibrillar proteins โปรตีนไมโอซินมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญ 3 ประการ ได้แก่ ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ATPase สามารถจับกับแอคติน และสามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนไมโอซินเพื่อรวมตัวเป็นเส้นใยโปรตีน (Hultin, 1985: Bandman, 1987) โครงสร้างของโปรตีนไมโอซิน ดังแสดงในรูป 2.6 และดึงหรือปล่อยคลายจากแอคตินทำให้เกิดการหดหรือคลายตัวของกล้ามเนื้อได้



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของโมเลกุลไมโอซิน
ที่มา : Bandman (1987)

โมเลกุลของไมโอซินประกอบด้วย myosin heavy chain 2 สาย แต่ละสายของ myosin heavy chain จะรวมตัวกันด้วย α- helical conformation และที่ส่วนหัวของไมโอซินเป็น NH_2- terminus และมี alkali light chain 1 สาย และ DTNB light chain 1 สาย สำหรับในส่วนของ alkali light chain มี reactive site ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ATPase (Bandman, 1987; Kijowski, 2001) ดังแสดงในรูป 2.6 (A)

ไมโอซินประกอบด้วยกลุ่มอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรดจำนวนมาก ได้แก่ aspartic acid และ glutamic acid นอกจากนี้ยังมีกลุ่มอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง ได้แก่ histidine, lysine, และ arginine โมเลกุลไมโอซินจึงมีประจุรวมเป็นลบและมีค่า isoelectric point เท่ากับ 5.3 (Kijowski, 2001) ในส่วนหัวของไมโอซินมีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic และมี sulfhydryl groups จำนวนมาก แต่ไม่พบ disulfide bond (Xiong, 1994) เส้นใยไมโอซินประกอบด้วยโมเลกุลไมโอซินประมาณ 400 โมเลกุล เรียงตัวกันอย่างหนาแน่นและหันส่วนหัวของโมเลกุลออกไปยังผิวด้านหน้าของเส้นใยฝอย เมื่อแบ่งเส้นใยไมโอซินที่ตำแหน่ง central axis ออกเป็น 2 ส่วน เส้นใยไมโอซินจะแสดงคุณสมบัติเป็น biopolar symmetry หรือเป็นภาพกระจกเงาที่เหมือนกันระหว่างด้านซ้ายและขวา ดังรูปที่ 2.6 (B)

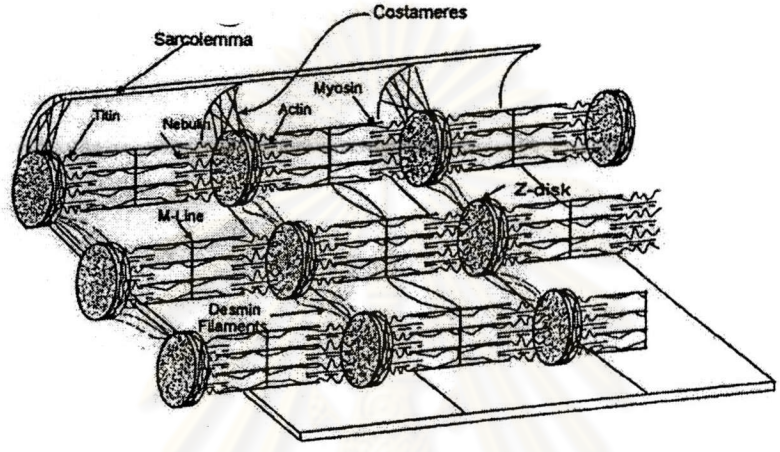
แอคตินจัดเป็น globular protein ที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 1 สาย โปรตีนแอคตินมีปริมาณมากรองลงมาจากไมโอซินโดยมีประมาณ 20% ของ myofibrillar protein โมเลกุลของแอคตินมีกรดอะมิโน proline และ glycine อยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้โครงสร้างโมเลกุลแอคตินเป็นชนิด α-helix และ globular shape และมีค่า isoelectric point ประมาณ 4.8 โปรตีนแอคตินจะจับกับไมโอซินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน เพื่อทำหน้าที่ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ (Hultin, 1985; Kijowski, 2001)

2.4.2 โปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อและควบคุมเส้นใยโปรตีนให้อยู่ในตำแหน่งภายในซาร์โคเมียร์ (regulatory proteins)

โปรตีนในกลุ่ม regulatory proteins ที่มีปริมาณมาก คือ tropomyosin และ troponin มีประมาณ 3 และ 4.5 % ของ myofibrillar protein ตามลำดับ โดยทำหน้าที่ในการควบคุมการยืดหดตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีกลุ่มโปรตีนที่มีปริมาณน้อยและทำหน้าที่ควบคุมเส้นใยกล้ามเนื้อ ให้อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องภายในซาร์โคเมียร์ (Pearson and Young, 1989) ได้แก่ α–actinin, β-actinin และ Eu-actinin ดังรายละเอียดในตารางที่ 2.1

2.4.3 โปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดจับหรือเชื่อมโยงเส้นใยโปรตีนให้อยู่ในตำแหน่งของโครงสร้างกล้ามเนื้อ (cytoskeletal proteins)

cytoskeletal proteins หรือบางครั้งเรียกว่า scaffold proteins เป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดจับหรือเชื่อมโยงเส้นใยโปรตีน ให้อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องของโครงสร้างกล้ามเนื้อ ตำแหน่งของ cytoskeletal proteins ใน sarcomeres (Kijowski, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.7

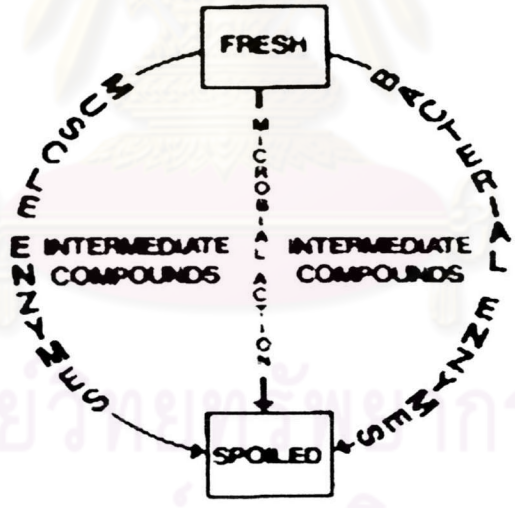


รูปที่ 2.7 cytoskeletal proteins ในเส้นใยกล้ามเนื้อ
ที่มา : Kijowski (2001)

cytoskeletal proteins สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดจับระหว่าง (internal supporting) เส้นใยโปรตีน (myofibril) และกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดจับนอก (external supporting) เส้นใยโปรตีน เส้นใย titin และ nebulin เป็นเส้นใยชนิด internal supporting ที่ทำหน้าที่ช่วยยึดเส้นใยไมโอซินและแอคตินให้อยู่ใน sarcomeres ส่วน external supporting เป็นกลุ่มintermediate filaments ที่ช่วยยึดจับและทำหน้าที่เชื่อมโยงเส้นใยโปรตีนให้อยู่ตรงตำแหน่งของ disc level ได้แก่ โปรตีน desmin, filamin และ X-protein นอกจากนี้ยังมีกลุ่ม cytoskeletal proteins ที่ทำหน้าที่เป็น submembral protein ยึดจับกับ Z-line ให้อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง ได้แก่ costameres (Bandman,1987; Pearson and Young, 1989; Kijowski, 2001)

2.5 การเน่าเสียของสัตว์น้ำ

เนื่องจากสัตว์น้ำต่างๆ เป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางโปรตีนสูง และยังมีกรดอะมิโน สารนิวคลีโอไทด์เป็นจำนวนมาก จึงทำให้เกิดการเสื่อมเสียได้ง่ายหลังจากสัตว์น้ำตาย และการเสื่อมเสียเกิดขึ้นได้เร็วหลังระยะเกร็งตัวของสัตว์น้ำ (Sikorski and Pan, 1994) เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยตัวเองในระยะแรกเข้าย่อยโปรตีน ทำให้แบคทีเรียสามารถใช้สารอาหารเหล่านั้นในการเจริญเติบโตได้ หลังจากนั้นเอนไซม์จากแบคทีเรียจะเริ่มเข้ามามีบทบาทในการย่อยเนื้อเยื่อต่างๆ ทำให้เกิดการเสื่อมเสียมากยิ่งขึ้น (Davis, 1995) การเน่าเสียของสัตว์น้ำจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องตั้งแต่ก่อนสัตว์น้ำตายซึ่งจะเกิดขึ้นเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับวิธีการจับและแหล่งจับสัตว์น้ำ และอุณหภูมิการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ การเสื่อมเสียของสัตว์น้ำเกิดจากสาเหตุหลักที่สำคัญ คือ จากปฏิกิริยาเอนไซม์ในตัวสัตว์น้ำเอง และจากปฏิกิริยาเอนไซม์ของแบคทีเรีย (Pedraja,1970) ดังแสดงในภาพที่ 2.8 การทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวสัตว์น้ำเองและจากจุลินทรีย์จะทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อถูกย่อยสลาย และเป็นผลให้สัตว์น้ำเกิดการเน่าเสีย (Botta, 1994; Davis, 1995)



รูปที่ 2.8 สาเหตุการเน่าเสียของสัตว์น้ำ
ที่มา : Pedraja (1970)

2.6 การย่อยสลายของโปรตีน (protein hydrolysis)

การย่อยสลายของโปรตีนเป็นการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีน เนื่องจากการทำงานของ hydrolytic enzymes และเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพด้อยลง โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัสที่มีลักษณะนิ่มลงของสัตว์น้ำในระหว่างการเก็บรักษาไว้ในน้ำแข็ง (Haard, 1994, Davis, 1995; Ashie and Simpson, 1997)

เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของสัตว์น้ำ ในระหว่างการเก็บรักษา มีแหล่งสำคัญมาจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ภายในตัวสัตว์น้ำเอง (endogenous proteinases) และจากกลุ่ม spoilage bacteria ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Venugopal, Alur and Lewis. 1983; Angel et al., 1986b)

2.6.1 เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่มีอยู่ในตัวสัตว์น้ำเอง

สัตว์น้ำที่ยังมีชีวิตจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีอยู่ตลอดเวลา เช่น กระบวนการสร้างและสลาย (metabolism) แต่สัตว์น้ำที่ตายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีอีกลักษณะหนึ่ง โดยหลังจากที่สัตว์น้ำตายการขนส่งออกซิเจนจะหยุดชะงัก ทำให้เนื้อเยื่อขาดออกซิเจนแต่เซลล์เนื้อเยื่อต้องการพลังงานเพื่อใช้ในการยืดหดตัว ซึ่งพลังงานนี้สะสมอยู่ในรูปของ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท polyphosphate ดังนั้น ATP จะถูกใช้ไปโดยกระบวนการ ATP hydrolysis และมีการสร้าง ATP ใหม่เกิดขึ้นมาชดเชย จึงทำให้ปริมาณ ATP ในเนื้อเยื่อมีความคงที่ชั่วเวลาหนึ่ง ระยะที่ระดับ ATP คงที่ในเนื้อเยื่อนี้กล้ามเนื้อจะยังไม่เกิดการเกร็งตัวจึงเรียกว่าระยะก่อนการเกร็งตัว (pre-rigor mortis stage) การขาดออกซิเจนในเนื้อเยื่อทำให้เกิดการสร้าง ATP จากกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งเป็นผลให้ระดับความเป็นกรด-ด่างของเนื้อเยื่อลดต่ำลงเนื่องจากมีกรดแลกติคเกิดขึ้น (Hultin, 1985; Pearson and Young, 1989)

เมื่อเข้าสู่ระยะเกร็งตัว (rigor mortis stage) กล้ามเนื้อจะมีลักษณะเกร็งตัวและหดตัวเกิดขึ้นเนื่องจากโปรตีนที่ประกอบอยู่ในเส้นใยเนื้อเยื่อ คือ actin จะรวมตัวกับ myosin ได้ actomyosin สำหรับการคลายตัวจะต้องอาศัยพลังงานจาก ATP เมื่อปริมาณ ATP ในเนื้อเยื่อเริ่มลดต่ำลงทำให้เกิดการรวมตัวของโปรตีน actomyosin อย่างถาวร เป็นผลให้กล้ามเนื้อเริ่มเกิดการเกร็งและสูญเสียความสามารถในการยืดตัว (extensibility) (Hultin, 1985: Pearson and Young, 1989) ซึ่งความสามารถในการยืดตัวนี้มีมากที่สุดในช่วง pre-rigor ในระยะการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อน้ำย่อยจากตัวสัตว์น้ำเองและแบคทีเรียจะเข้าทำลายเนื้อเยื่อได้ยาก ดังนั้นถ้าสามารถ

ยืดระยะเวลาในการเกร็งตัวให้นานขึ้นจะทำให้สามารถรักษาคุณภาพของสัตว์น้ำไว้ได้นาน เมื่อสิ้นสุดระยะการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อจะค่อยๆ อ่อนตัวลงจากนั้นจะมีการย่อยสลายเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวสัตว์น้ำเอง (Etherington and Bardsley, 1995; Ashie and Simpson, 1997)

เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่มีอยู่ในตัวสัตว์น้ำเอง สามารถพบได้ในอวัยวะย่อยอาหาร เซลล์กล้ามเนื้อ และของเหลวที่อยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อละเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยทั่วไปจะใช้คุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ ที่สามารถทำงานได้ในสภาวะความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน เป็นเกณฑ์ในการแบ่งกลุ่มการทำงานของเอนไซม์ (Haard, 1994; Etherington and Bardsley, 1995; Ashie and Simpson, 1997)

2.6.1.1 เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในอวัยวะย่อยอาหาร

เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบมากในอวัยวะย่อยอาหาร หรือบริเวณช่องท้องของปลา ได้แก่ pepsin และ trypsin ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาย่อยสลายตัวเองจะเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่สัตว์น้ำตาย ทำให้มีการรั่วของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากช่องท้องหรืออวัยวะย่อยอาหารออกมาในส่วนของกล้ามเนื้อ เป็นผลให้กล้ามเนื้อมีเนื้อสัมผัสนิ่มลง (Davis, 1995) ในกุ้งก้ามกรามพบว่าอวัยวะย่อยอาหารจะอยู่บริเวณส่วนหัวของกุ้ง (รูปที่ 2.3) ซึ่งติดกับบริเวณส่วนลำตัวที่เป็นกล้ามเนื้อ

การศึกษาชนิดและการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่มีอยู่ในอวัยวะย่อยอาหารของกุ้งก้ามกรามมีจำนวนค่อนข้างจำกัด งานวิจัยของ 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 ยังสามารถทำงานไดที่อุณหภูมิ 0 °C แต่มีการทำงานช้ากว่าที่อุณหภูมิ 37 °C จากผลการศึกษาของคณะผู้วิจัย (Baranowski, Nip and Moy,1984; Nip, Lan and Moy, 1985) ซึ่งได้เสนอแนะว่าการนิ่มของเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ในน้ำแข็ง คาดว่าเป็นผลมา

จากการรั่วของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแหล่ง hepatopancreas เกิดการแพร่ออกไปยังกล้ามเนื้อ และเป็นผลให้โปรตีนกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายและมีการเสื่อมเสีย

Trypsin เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม serine proteinase และมีจำนวนหลายชนิด สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ trypsin คือมีค่า pH ประมาณ 6.5-8.0 และมีอุณหภูมิอยู่ในช่วงประมาณ 37-40 °C การทำงานของ trypsin มีผลต่อการเสียหายโปรตีนไมโอซิน และ cytoskeletal proteins ที่อยู่ภายในโครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อ (Haard, 1994; Etherington and Bardsley, 1995; Kolodziejska and sikorski, 1996; Kim, Meyers and Godber, 1996)

Collagenases เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายคอลลาเจน และทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อเกิดการเสื่อมเสีย (Haard, 1994; Nip, Lan and Moy, 1985) สำหรับกลไกการทำงานของ collagenases ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เนื่องจาก collagenases ที่สกัดได้มีเสถียรภาพต่ำ นอกจากนี้ขั้นตอนในการวิเคราะห์คุณสมบัติและการทำงานของ collagenases ยังเป็นวิธีที่มีความยุ่งยากในการปฏิบัติ

2.6.1.2 เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในเซลล์กล้ามเนื้อ

ชนิดของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบมากอยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อของสัตว์น้ำ ได้แก่ lysosomal proteinases, alkaline proteinases และ neutral proteinases (Haard, 1994)

เอนไซม์ในกลุ่ม lysosomal proteinases ส่วนมากเป็น cathepsin และมี hydrolytic enzymes บ้าง กลุ่มของ cathepsin (A, B, C, D, H, และ L) สามารถตัดสายพันธะเปปไทด์ได้ทั้งแบบ endopeptidase และ/หรือ exopeptidase ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของ cathepsin คือ pH ที่มีค่าอยู่ในช่วงความเป็นกรด แต่มี cathepsin บางตัวสามารถทำงานได้ดีที่สภาวะ pH เป็นกลาง cathepsin ที่พบในกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำส่วนมากเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่จัดอยู่ในประเภท cystein และมีประเภท serine และ aspartic บ้าง (Ashie and Simpson, 1997) สำหรับ lysosomal proteinases ที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำ พบว่ามีบทบาทความสำคัญน้อยที่จะทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อเกิดการเสียหาย อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการทำงานของ cathepsin B และ D พบว่าสมารถย่อยสลายโปรตีนไมโอซิน แอคติน โทโพนิน ได้ (Haard, 1994; Jiang, Lee and Chen, 1996) นอกจากนี้ cathepsin D-like protease ที่สกัดได้จากเนื้อปลานิลพบว่าทำให้ Z-disk ของเส้นใยกล้ามเนื้อเกิดการเสียหาย รวมทั้งมีการสูญเสีย α- actinin (Jiang et al., 1990)

Alkaline proteinases เป็นเอนไซม์ที่พบในซาร์โคพลาสที่อยู่ล้อมรอบเส้นใยกล้ามเนื้อ หรือใน microsomal fraction การทำงานของ alkaline proteinases คาดว่าจะทำให้เกิดการเสียหายของ cytoskeletal network ของโครงสร้างกล้ามเนื้อ (Busconi et al., 1989)

Neutral proteinases เป็นเอนไซม์ที่มีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมอยู่ในช่วง pH เข้าใกล้ 7 เอนไซม์ที่สำคัญในกลุ่มนี้ คือ calpains พบอยู่ในซาร์โคพลาส การทำงานของ calpains ทำให้ Z-disk เสียหายและส่งผลให้เส้นใยไมโอซินและแอคตินสูญเสียการจัดเรียงตัวภายในเส้นใยกล้ามเนื้อ และยังสามารถทำให้ cytoskeletal proteins เสียหาย (Haard, 1994)

2.6.1.3 เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในของเหลวระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

เอนไซม์ที่อยู่ในของเหลวระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ส่วนมากเป็น collagenases ซึ่งสามารถย่อยสลาย collagen และทำให้คุณภาพเนื้อสัมผัสของสัตว์น้ำมีการเสื่อมเสีย (Sikorski, Scott and Buisson, 1984; Nip, Lan and Moy, 1985; Hernandez-Herrero et al., 2003) สำหรับกลไกการทำงานของ collagenases ใน extracellular matrix ของกล้ามเนื้อยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่ามีงานวิจัยที่ศึกษาการเสียหายของ proteoglycans ซึ่งเป็น basement membrane ที่ให้ความแข็งแรงกับโครงสร้างของเส้นใยคอลลาเจนในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน endomysium และ perimysium จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ proteoglycans ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่า proteoglycans มีการเสียหายและมีปริมาณลดลงในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อปลา Pacific rockfish และ เนื้อวัว (Kim and Haard, 1992; Nishimura, Hattori and Takahashi, 1995) การเสียหายของ proteoglycans เป็นปัจจัยทำให้โครงสร้างภายในของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูญเสียความแข็งแรง และส่งผลให้กล้ามเนื้อมีเนื้อสัมผัสนิ่มลง

นอกจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ภายในตัวสัตว์น้ำเองแล้ว ยังพบว่ามีกลุ่มจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน และสามารถทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อเกิดการเสื่อมเสียได้ในระหว่างการเก็บรักษาสัตว์น้ำไว้ในน้ำแข็งหรือที่อุณหภูมิต่ำ (Venugopal, Alur and Lewis,1983)

2.6.2 การเสื่อมเสียที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนจากแบคทีเรีย

แหล่งของจุลินทรีย์ที่สำคัญมาจากการปนเปื้อนของแหล่งน้ำ (Krishnamurthy and Karunasagar, 1985; Jeyasekaran and Ayyappan, 2002) เอนไซม์จากแบคทีเรียจะทำหน้าที่ย่อยสลายสารต่างๆของสัตว์น้ำโดยเฉพาะโปรตีน ทำให้สัตว์น้ำมีกลิ่นเหม็นและเน่าเสีย (นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531; Liston, 1985; Jacober and Rand, 1985; Botta, 1995; Davis, 1995) ผลจากการย่อยสลายโปรตีนของกลุ่มแบคทีเรียทำให้เกิดสารแอมโมเนีย อินโดล อะมีน หรือไฮโดรเจนซัลไฟต์ รวมทั้งสารที่มีกลิ่นเหม็นที่สามารถระเหยได้ทำให้เกิดกลิ่นไม่ดีในอาหารนั้นๆ โดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนีย พบว่าสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเสื่อมเสียคุณภาพของสัตว์น้ำ แอมโมเนียเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์หลายชนิด ที่สามารถไฮโดรไลซ์โปรตีนได้ เอนไซม์ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์จะย่อยสลายโปรตีนให้แอมโมเนียได้ 3 ทางด้วยกัน (นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531; Jacober and Rand, 1985; Botta, 1994) คือ

1. กระบวนการ deamination, decarboxylation และ oxidation จะได้กรดไขมันกับแอมโมเนีย ดังปฏิกิริยา

$$R\text{-}CH\ NH_2\ COOH + H_2O + O_2 \longrightarrow R\text{-}COOH + H_2O + CO_2 + NH_3$$

2. กระบวนการ deamination และ decarboxylation จะได้แอลกอฮอล์และแอมโมเนีย ดังปฏิกิริยา

$$R\text{-}CHNH_2\ COOH + H_2O \longrightarrow R\text{-}CH_2OH + CO_2 + NH_3$$

3. กระบวนการ reduction deamination จะได้กรดและแอมโมเนีย ดังปฏิกิริยา

$$COOH\text{-}CH\ NH_2COOH \longrightarrow COOHCH_2\ COOH + NH_3$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในสัตว์น้ำที่มีกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์รวมอยู่ด้วย เช่น cystein cystine และ methionine เมื่อถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรีย จะสลายตัวให้สารที่มีกลิ่นซัลเฟอร์ เช่น hydrogensulfide dimethylsulfide และ methyl mercaptan (นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531) นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีของสารประกอบต่างๆ ที่มีอยู่ในตัวสัตว์น้ำโดยเฉพาะปฏิกิริยาที่เกิดจากออกซิเจนกับไขมัน ทำให้สัตว์น้ำมีกลิ่นเหม็นหืนและรสชาติไม่ดี การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมักเกิดขึ้นกับสัตว์น้ำประเภทที่มีไขมันมาก ไขมันของสัตว์น้ำมีความไม่อิ่มตัวสูงจึงสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย

สัตว์น้ำที่สดจะมีรสดีจะไม่มีกลิ่นคาวและกลิ่นเหม็น การบริโภคสัตว์น้ำที่จับขึ้นมาจากแหล่งน้ำใหม่ๆ ให้คุณภาพความสดดีที่สุด แต่เนื่องจากการจับในปริมาณมากและผู้ซื้ออยู่ในท้องถิ่นที่ไกลออกไป จึงจำเป็นต้องมีวิธีการรักษาความสดของสัตว์น้ำให้คงอยู่นานที่สุด ปัจจัยสำคัญในการรักษาความสดของสัตว์น้ำ ได้แก่ การลดอุณหภูมิภายในตัวของสัตว์น้ำ เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์และปฏิกิริยาเคมีต่างๆจะเกิดได้ช้า รวมทั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีอัตราลดลงจึงช่วยรักษาคุณภาพของเนื้อสัตว์น้ำให้คงความสดอยู่ได้นาน (Botta, 1994; Davis, 1995) การรักษาความสะอาดเครื่องมือเครื่องใช้และน้ำใช้ที่ต้องสัมผัสกับสัตว์น้ำจะช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ สำหรับการล้างด้วยน้ำสะอาดจะช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ผิวได้มาก

การที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีนั้นจะต้องเริ่มปฏิบัติอย่างถูกต้อง ตั้งแต่จับสัตว์น้ำขึ้นจากแหล่งน้ำเรื่อยไปจนกระทั่งนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จ การแปรรูปใดๆ ที่เริ่มจากวัตถุดิบที่ด้อยคุณภาพย่อมจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สำเร็จที่ด้อยคุณภาพเช่นกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 การรักษาคุณภาพสัตว์น้ำที่อุณหภูมิใกล้จุดเยือกแข็ง

การลดอุณหภูมิของสัตว์น้ำให้ต่ำแต่สูงกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำ เป็นวิธีการเก็บรักษาสัตว์น้ำด้วยความเย็น วิธีนี้จัดเป็นการรักษาคุณภาพระยะสั้นของสัตว์น้ำ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และการเจริญของจุลินทรีย์ให้เกิดขึ้นได้ช้าลง ปัจจัยที่มีผลต่ออายุการเก็บรักษาสัตว์น้ำด้วยความเย็นขึ้นกับ ชนิดของสัตว์น้ำ ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น และสภาวะการเก็บรักษา (Sikorski and Pan, 1994; Botta, 1995)

สัตว์น้ำแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกัน เช่น ปริมาณ TMAO ชนิดและปริมาณของไขมัน รวมทั้งชนิดของเอนไซม์ที่มีอยู่ในสัตว์น้ำ จึงทำให้ปฏิกิริยาการเสื่อมเสียทางเคมีและการทำงานของเอนไซม์มีความแตกต่างกัน (Owusu-Ansah, and Hultin, 1986) สำหรับปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นพบว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณภาพการเสื่อมเสียของสัตว์น้ำ เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ทำให้มีการย่อยสลายโปรตีนหรือไขมันและได้สารที่มีกลิ่นเหม็นรวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสที่ไม่ดี (Jacober and Rand, 1985; Botta, 1994) การใช้อุณหภูมิต่ำในการเก็บรักษาสัตว์น้ำจะช่วยทำให้ปฏิกิริยาการเสื่อมเสียต่างๆ และการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ช้าลง (Taub and Singh, 1997; Davis, 1995) แต่อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาสัตว์น้ำด้วยความเย็นจะมีข้อจำกัดของอายุการเก็บรักษาที่สั้น เนื่องจากองค์ประกอบและคุณสมบัติของสัตว์น้ำที่มีการเสื่อมเสียได้เร็ว (Angel et al., 1986a; Fatima et al., 1988)

การเสื่อมเสียคุณภาพของสัตว์น้ำในระหว่างการเก็บรักษาด้วยความเย็น สามารถใช้การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ ชีวเคมี จุลินทรีย์ และการเสียหายของโครงสร้างกล้ามเนื้อเป็นตัวบ่งชี้การเสื่อมเสีย ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาถึงการเสื่อมเสียคุณภาพของกุ้งในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ได้แก่

Matches (1982) ได้รายงานว่าการเก็บรักษากุ้ง *(Pandalus jordani)* ไว้ที่อุณหภูมิ 0 $^{\circ}$C เป็นเวลา 0-13 วัน กุ้งยังคงมีคุณภาพกลิ่นเป็นที่ยอมรับในระหว่างการเก็บรักษาไว้นานถึง 6 วัน หลังจากนั้นกุ้งจะมีกลิ่นเน่าเหม็นและไม่เป็นที่ยอมรับ ผลที่ได้สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้ทั้งหมด โดยพบว่าจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 10^6 และเพิ่มขึ้นเป็น $> 10^8$ cfu/g เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษา 13 วัน

Angel และคณะ (1986) รายงานว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ไว้ที่อุณหภูมิ 1 $^{\circ}$C เป็นเวลานาน 28 วัน กุ้งจะมีเนื้อสัมผัสนิ่มและ และจากการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้ทั้งหมดพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 เป็น 10^8 cfu/g เมื่ออายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน

Nip และ Moy (1988) รายงานว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกล้ามเนื้อของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็ง (0-7 วัน) และนำมาต้มสุก โดยพบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น สังเกตว่ามีการเสียหายของ Z-line และ H-zone มากขึ้น

Fatima และคณะ (1988) รายงานว่าการเก็บรักษากุ้ง (*Penaeus merguiensis*) ไว้ในน้ำแข็ง กุ้งยังคงมีคุณภาพดีเป็นที่ยอมรับถึง 8 วัน หลังจากอายุการเก็บรักษามากกว่า 8 วัน กุ้งจะมีคุณภาพเน่าเสียและมีเนื้อสัมผัสนิ่มเละ โดยสัมพันธ์กับการเสื่อมเสียคุณภาพทางจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่าจำนวนจุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น คือ 10^5 เป็น 10^6 และ 10^7 cfu/g เมื่ออายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 8 และ 16 วัน ตามลำดับ

Papadopoulos และคณะ (1989) ศึกษาการเปลี่ยนแปลง ultrastructure ของกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีการเสียหายของ Z-line และการฉีกขาดของเส้นใยกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถสกัด myofibrillar protein ได้มากขึ้น เมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น

Lindner และคณะ (1989) พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลง SDS-PAGE ของ myofibrillar protein เพียงเล็กน้อย โดยพบว่ามีแถบโปรตีนที่อยู่ต่ำกว่าโปรตีนไมโอซินเกิดใหม่เพียง 1 แถบ

Kim และคณะ (1996) พบว่าการเก็บรักษากุ้งน้ำจืด Crayfish ไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลานานขึ้น myofibrillar protein จะมีการละลายได้มากขึ้น โดยเสนอแนะว่าอาจเป็นผลจากการทำงานของ proteolytic enzymes

Martinez, Friis and Careche (2001) รายงานว่ามีการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษากุ้ง (*Pandalus borealis*) ไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C จากการวิเคราะห์ผลด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนไมโอซินมีความเข้มลดลง และมีการหายไปของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 67 และ 50 kDa นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 50 kDa เมื่ออายุการเก็บรักษานาน 5 วัน ซึ่งต่างจากการเก็บรักษากุ้ง (*Penaeus monodon*) ที่พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีน ส่วนในกุ้ง (*Penaeus japonicus*) มีการเพิ่มขึ้นของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100 kDa เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 4 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8 การรักษาคุณภาพสัตว์น้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง

การแช่เยือกแข็งเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถเก็บรักษาอาหารไว้ได้นาน โดยจะช่วยรักษาคุณภาพทั้งในรูปกลิ่นรส สี ไว้ได้ดีมากเมื่อเทียบกับวิธีถนอมอาหารอื่นๆ แต่จะสามารถรักษาลักษณะเนื้อสัมผัสไว้ได้ปานกลางเท่านั้น เนื่องจากวิธีการแช่เยือกแข็งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ซึ่งสัมพันธ์กับการสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน (Xiong,1997; Zayas, 1997) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัส หรือกลิ่นรส ของผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง โดยเฉพาะการเสื่อมเสียของเนื้อสัมผัสซึ่งเป็นคุณลักษณะสำคัญของผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง ถึงแม้ว่าในบางครั้งผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งบางชนิดจะมีการเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสที่นิ่มเละมากขึ้น (Taub and Singh, 1997) ผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งมีคุณภาพดีขึ้นกับชนิดของสัตว์น้ำ สภาวะการเก็บรักษาสัตว์น้ำก่อนการแช่เยือกแข็ง และยังขึ้นกับปัจจัยของการแช่เยือกแข็ง การเก็บรักษา และวิธีการละลายน้ำแข็งออกจากผลิตภัณฑ์

หลักพื้นฐานของกระบวนการแช่เยือกแข็งคือ การลดอุณหภูมิของอาหารให้เท่ากับหรือน้อยกว่า –18 °C เพื่อให้สิ่งมีชีวิตไม่สามารถดำเนินปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่อไปได้ โดยมีหลักสำคัญ คือ การเปลี่ยนแปลงสถานะของน้ำอิสระ (free water) ในอาหารจากของเหลวกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง เพื่อมิให้น้ำนั้นสามารถทำหน้าที่ต่างๆในปฏิกิริยาเคมี และไม่เป็นสับสเตรทให้กับเชื้อจุลินทรีย์ (Fennema, Powrie and Marth, 1973; George, 1993; Reid, 1997)

2.9 การตกผลึก (crystallization)

กระบวนการตกผลึกเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในกระบวนการแช่เยือกแข็ง และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง กระบวนการตกผลึกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะด้วยกัน คือ ระยะการเกิดนิวเคลียสผลึก (nucleation) และระยะการโตของผลึก (crystal growth) (Fennema, Powrie and Marth, 1973; George, 1993; Reid, 1997)

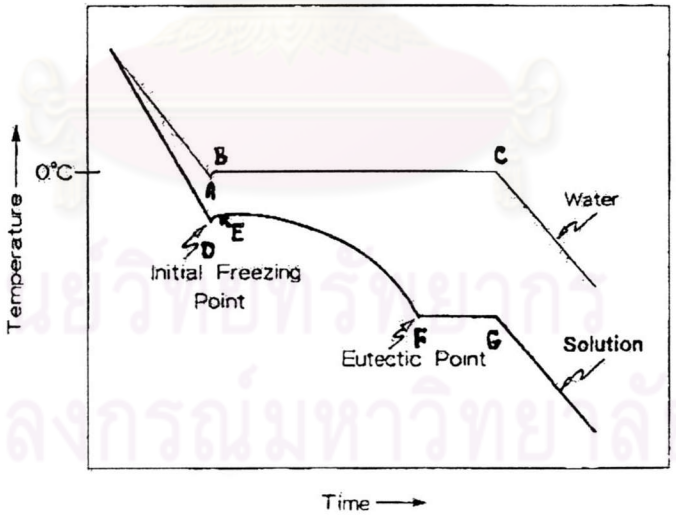
การเกิดนิวเคลียสผลึกจะเริ่มขึ้นเมื่อสภาวะเอื้ออำนวยให้โมเลกุลหลายๆ โมเลกุลมาจับตัวกันเป็นอนุภาคเล็กๆ ที่มีระเบียบและมีขนาดโตพอที่จะสามารถอยู่ได้และเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการโตของผลึกต่อไป เรียกว่านิวเคลียสผลึก ชนิดของการเกิดนิวเคลียสผลึกสามารถแบ่งอออกได้ 2 แบบ คือ การเกิดนิวเคลียสผลึกของสารเนื้อเดียวกัน และการเกิดนิวเคลียสผลึกของสารเนื้อผสม น้ำถ้ามีความบริสุทธิ์มากๆ จะมีลักษณะการเกิดนิวเคลียสผลึกแบบสารเนื้อเดียวกัน การเกิดนิวเคลียสผลึกของสารเนื้อเดียวกันจะไม่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 0 °C แต่จะเกิดที่อุณหภูมิใกล้ –41 °C

ทั้งนี้เพราะว่าที่อุณหภูมิ –41 °C ถือว่าเป็นอุณหภูมิจำกัดที่น้ำจะอยู่ในสภาวะซุปเปอร์คูล สำหรับการเกิดนิวเคลียสผลึกของสารเนื้อเดียวกันจะไม่ค่อยพบในทางปฏิบัติ

การโตของผลึกจะมีลักษณะตรงข้ามกับการเกิดนิวเคลียสผลึก การโตของผลึกจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิใกล้ๆ กับจุดเยือกแข็ง ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการโตของผลึกได้แก่ อุณหภูมิ และอัตราการดึงความร้อนออก เมื่ออุณหภูมิลดลงอัตราการโตของผลึกจะลดลง สำหรับอัตราการดึงความร้อนออกพบว่าอัตราการโตของผลึกน้ำแข็งจะเพิ่มขึ้น เมื่อความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างผิวหน้าของผลึกน้ำแข็งกับอุณหภูมิของส่วนที่ยังไม่แข็งตัวมีค่ามาก ดังนั้นถ้าดึงความร้อนออกจากระบบหรืออาหารได้เร็วจะทำให้อัตราการโตของผลึกน้ำแข็งมีแนวโน้มลดลง (George, 1993)

2.10 แผนภาพของการแช่เยือกแข็ง

แผนภาพการแช่เยือกแข็งของน้ำและสารละลายแบบง่าย จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์กับระยะเวลาการแช่เยือกแข็ง หรือการดึงความร้อนออกจากผลิตภัณฑ์ (Fennema, Powrie and Marth, 1973; George, 1993) ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แผนภาพการแช่เยือกแข็งของน้ำและสารละลายแบบง่าย
ที่มา ; George, 1993)

แผนภาพการแช่เยือกแข็งของน้ำบริสุทธ์ พบว่าจุด A เป็นจุดซุปเปอร์คูลของน้ำ ซึ่งจะเกิดขึ้นเสมอก่อนที่การตกผลึกจะเกิดขึ้น ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กและมีลักษณะเป็นสารบริสุทธิ์จะมีแนวโน้มเกิดซุปเปอร์คูล ในขณะที่ตัวอย่างขนาดใหญ่หรือมีสารอื่นปะปนจะเกิดซุปเปอร์คูลเพียงเล็กน้อย เมื่อกระบวนการนิวเคลียสผลึกเกิดขึ้นการตกผลึกของน้ำแข็งก็จะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน การตกผลึกจะให้ค่าความร้อนแฝงของน้ำในการเกิดผลึกออกมา ทำให้อุณหภูมิของสารละลายเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงอุณหภูมิจุดเยือกแข็งของน้ำบริสุทธิ์ และอุณหภูมิจะคงที่จนน้ำกลายเป็นน้ำแข็งหมด (B-C) เมื่อน้ำเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็งหมดก็จะมีการคายพลังงานความร้อนออกมา ทำให้อุณหภูมิของระบบลดลงอีก

แผนภาพการแช่เยือกแข็งสารละลายแบบง่าย พบว่าในระยะแรกของการแช่เยือกแข็งจะเป็นการดึงความร้อนสัมผัสออกจากระบบ ทำให้อุณหภูมิของสารละลายลดลงแต่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะของน้ำ จนกระทั่งอุณหภูมิของสารละลายลดลงถึงจุด D หรือเรียกว่า initial freezing point จะเริ่มมีการเกิดนิวเคลียสผลึกและมีการโตของผลึกเกิดขึ้น การเกิดผลึกน้ำแข็งทำให้มีการปล่อยค่าความร้อนแฝงออกมา เป็นผลให้สารละลายมีอุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงอุณหภูมิเยือกแข็ง (E) เมื่อมีการดึงความร้อนออกจากระบบต่อไปอุณหภูมิของสารละลายจะลดลง ในระยะนี้น้ำจะเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นผลึกน้ำแข็งทำให้สารละลายที่เหลืออยู่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและมีจุดเยือกแข็งต่ำลง เมื่อมีการดึงความร้อนออกอย่างต่อเนื่อง พบว่าส่วนของเหลวที่ไม่แข็งตัวซึ่งมีความเข้มข้นของตัวถูกละลายมากขึ้น จะเริ่มมีการตกผลึกของตัวถูกละลายเกิดขึ้น (F) จุดนี้เรียกว่า eutectic ซึ่งหมายถึงอุณหภูมิสูงสุดที่น้ำและตัวถูกละลายในระบบสามารถเกิดการตกผลึกได้มากที่สุด เมื่อมีการดึงความร้อนออกจากระบบต่อไปจะมีการเปลี่ยนสถานะของน้ำแต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (G) ในระยะนี้จะพบว่าน้ำและตัวถูกละลายจะตกผลึกพร้อมๆ กันในสัดส่วนที่คงที่ เมื่อการตกผลึกของน้ำและตัวถูกละลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะมีการคายความร้อนของผลึกออกมาทำให้อุณหภูมิของระบบมีค่าลดลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.11 อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง

การแช่เยือกแข็งจะเป็นผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในอาหาร ขนาดหรือการเปลี่ยนแปลงขนาดของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจะมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็ง เมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปละลายน้ำแข็งออก ถ้าผลึกน้ำแข็งเริ่มต้นมีขนาดเล็กก็จะมีโอกาสในการขยายขนาดของผลึกน้ำแข็งได้น้อยกว่าผลึกน้ำแข็งเริ่มต้นที่มีขนาดใหญ่ (Boast, 1985) ปัจจัยสำคัญของขนาดผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อหรือผลิตภัณฑ์ ได้แก่ อัตราเร็วของการดึงความร้อนออกจากผลิตภัณฑ์ หรืออัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นการแช่เยือกแข็งแบบช้า (slow หรือ sharp freezing) การแช่เยือกแข็งแบบเร็ว (rapid หรือ quick หรือ fast freezing) และการแช่เยือกแข็งแบบเร็วมาก (ultra rapid freezing) หลักในการกำหนดอัตราเร็วของการแช่เยือกแข็งในระดับต่างๆนั้นมีอยู่หลายวิธี ได้แก่ (Fennema, Powrie and Marth, 1973)

1. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อหน่วยเวลา

หลักการนี้อาจไม่ถูกต้องเท่าที่ควร เพราะในช่วงที่ผลิตภัณฑ์เปลี่ยนสภาวะใน 1 องศาเซลเซียสที่เปลี่ยนไปจะไม่สม่ำเสมอตลอดการแช่เยือกแข็ง และเนื่องจากอัตราการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในตัวอย่างนั้นผันแปรอย่างมากในระหว่างการแช่เยือกแข็ง ในทางปฏิบัติเป็นไปได้ยากที่จะใช้ค่าเฉลี่ยของอัตราการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตลอดช่วงเวลาของการแช่เยือกแข็ง

2. เวลาที่ผ่านไปในช่วงของอุณหภูมิที่ผลิตภัณฑ์แข็งตัว

หลักการนี้ใช้ช่วงความชันของส่วนของแผนภาพการแช่เยือกแข็งที่เป็นเส้นตรง (freezing plateau) โดยดูอัตราการแช่เยือกแข็ง (degree/unit time) ถ้าอุณหภูมิในช่วงของ freezing plateau ใช้เวลา 1 ชั่วโมง จัดเป็นอัตราการแช่เยือกแข็งแบบช้า ถ้าอุณหภูมิในช่วงของ freezing plateau ใช้เวลา 1-2 นาที จัดเป็นอัตราการแช่เยือกแข็งแบบเร็ว วิธีนี้ค่อนข้างเหมาะสมเนื่องจากการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งจะเกิดขึ้นในช่วงระยะสุดท้ายของการแช่เยือกแข็ง

3. ลักษณะของชั้นหน้าน้ำแข็ง

ถ้ามีน้ำแข็งเกิดขึ้นเป็นแผ่นจนแยกส่วนที่เป็นของแข็งและของเหลวได้ จัดว่าเป็นอัตราการแช่เยือกแข็งแบบช้า ถ้าเกิดผลึกน้ำแข็งจำนวนมากมาย ไม่มีชั้นแยกให้เห็นชัดเจนจัดเป็นอัตราการแช่เยือกแข็งแบบเร็ว ถ้าเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กมองไม่เห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจัดเป็นอัตราการแช่เยือกแข็งแบบเร็วมาก หลักการนี้เป็นคำจำกัดความที่ดีตรวจสอบได้แต่ไม่ค่อยแน่นอน

4. ความเร็วของการเกิดน้ำแข็งที่ผิวหน้า

วิธีนี้จะเป็นการวัดความเร็วของผิวหน้าน้ำแข็งที่เคลื่อนที่เข้าไปจากผิวนอกของผลิตภัณฑ์ เป็นหน่วยระยะทางต่อเวลา(เซนติเมตร/ชั่วโมง) หลักการนี้ถือว่าเหมาะสมเพราะสามารถวัดได้ค่อนข้างถูกต้อง อัตราเร็วในการแช่เยือกแข็งจากวิธีการแช่เยือกแข็งที่ต่างกัน โดยใช้หลักการวัดความเร็วของการเกิดผิวหน้าน้ำแข็ง แสดงดังตารางที่ 2.2

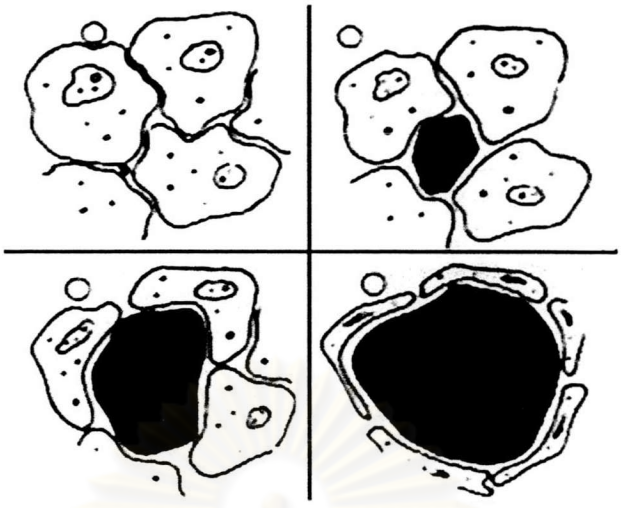
ตารางที่ 2.2 อัตราเร็วในการแช่เยือกแข็งจากวิธีการแช่เยือกแข็งที่ต่างกัน โดยใช้หลักการวัดความเร็วของการเกิดน้ำแข็งที่ผิวหน้า

วิธีในการแช่เยือกแข็ง	อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง (เซนติเมตร/ชั่วโมง)
Ultra rapid freezing	> 10
Rapid freezing	1-10
Normal freezing	0.3-1
Slow freezing	0.1-0.3
Very slow freezing	< 0.1

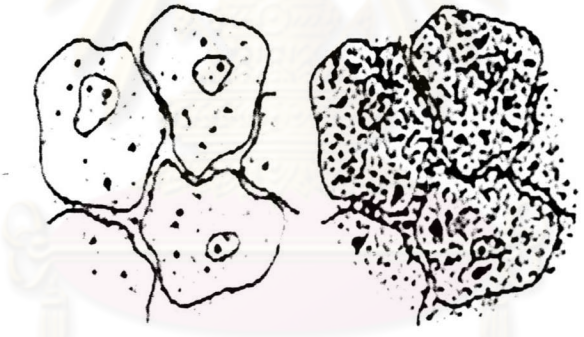
ที่มา : Boegh-Soerensen and Jul (1985)

5. ตำแหน่งที่เกิดผลึกน้ำแข็ง

ผลึกน้ำแข็งจะเกิดขึ้นที่ส่วนใดของเซลล์เนื้อเยื่อก็ตามขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อัตราเร็วในการแช่เยือกแข็ง อุณหภูมิของตัวอย่าง และลักษณะตามธรรมชาติของเซลล์ โดยทั่วไปการแช่เยือกแข็งแบบช้าจะเกิดผลึกขนาดใหญ่และเกิดขึ้นที่บริเวณภายนอกเซลล์ (extra cellular) เนื่องจากน้ำภายในเซลล์จะถูกดึงมาช่วยเพิ่มขนาดของผลึกที่ภายนอกเซลล์ เป็นผลให้เซลล์มีการหดตัวและมีขนาดลดลง กรณีที่เป็นการแช่เยือกแข็งแบบเร็วผลึกน้ำแข็งจะเกิดได้ทั้งภายในเซลล์ (intracellular) และภายนอกเซลล์ได้พร้อมๆกัน และมีการกระจายของผลึกน้ำแข็งอย่างสม่ำเสมอ จึงไม่ทำให้เซลล์เกิดการหดตัว ดังแสดงในรูปที่ 2.10 และ 2.11



ภาพที่ 2.10 การเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์เนื้อเยื่อโดยการแช่เยือกแข็งแบบช้า
ที่มา : Fennema, Powrie and Marth (1973)



ภาพที่ 2.11 การเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์เนื้อเยื่อโดยการแช่เยือกแข็งแบบเร็ว
ที่มา : Fennema, Powrie and Marth (1973)

6. วิธีอื่นๆ

นอกจากวิธีต่างๆดังกล่าว ยังมีวิธีการใช้อัตราการปลดปล่อยความร้อน (rate of heat liberation) และจำนวนเกล็ดน้ำแข็งที่เกิดขึ้นต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ต่อหน่วยเวลา เป็นต้น

2.12 การเสื่อมเสียคุณภาพของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง

การเปลี่ยนแปลงที่ส่งผลกระทบต่อการเสื่อมเสียคุณภาพของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง สามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงได้เป็น 4 ขั้นตอน (Fennema, Powrie and Marth, 1973) ได้แก่

2.12.1 การเปลี่ยนแปลงก่อนการแช่เยือกแข็ง

การเปลี่ยนแปลงก่อนการแช่เยือกแข็ง มีความสัมพันธ์กับคุณภาพความสดของสัตว์น้ำ และวิธีการเก็บรักษาสัตว์น้ำหลังจากการจับ โดยมีสาเหตุการเปลี่ยนแปลงคุณภาพที่สำคัญมาจากปฏิกิริยาเอนไซม์ในตัวสัตว์น้ำและปฏิกิริยาเอนไซม์จากแบคทีเรีย (Botta, 1994) ผลของปฏิกิริยาจากเอนไซม์ในตัวสัตว์น้ำทำให้มีการแตกตัวของสาร ATP และเกิดสารประกอบโมเลกุลเล็กๆ มากมาย ซึ่งมีผลต่อการเสื่อมเสียคุณภาพในด้านกลิ่นรส ส่วนผลการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเอนไซม์ที่สร้างโดยแบคทีเรียทำให้เกิดการย่อยสลายสารต่างๆ ในสัตว์น้ำโดยเฉพาะโปรตีน ทำให้ได้สารประกอบต่างๆ เช่น ไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด อินโดล และแอมโมเนียเพิ่มขึ้น การเสื่อมเสียดังกล่าวมีผลต่อคุณภาพความสดของน้ำลดลง (Botta, 1995) เนื่องจากคุณภาพของอาหารแช่เยือกแข็งขึ้นอยู่กับคุณภาพความสดของวัตถุดิบ หรือลักษณะคุณภาพของวัตถุดิบก่อนนำมาแช่เยือกแข็ง (Hultin, 1985) ดังนั้นในการกำหนดคุณภาพของสัตว์น้ำก่อนนำมาแช่เยือกแข็งให้มีความเหมาะสม จะช่วยรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งได้ดีจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อนำไปใช้ในทางปฏิบัติ

2.12.2 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็ง

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็ง เป็นผลมาจากการเสื่อมเสียเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสถานะของน้ำจากของเหลวไปเป็นผลึกน้ำแข็ง ปัจจัยสำคัญของการเสื่อมเสียคือ อัตราเร็วในการแช่เยือกแข็ง ในการแช่เยือกแข็งแบบช้าพบว่าผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นที่ภายนอกเซลล์ระหว่างช่องว่าง ขณะที่น้ำกลายเป็นผลึกน้ำแข็งทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายในส่วนของน้ำที่ไม่แข็งตัว ในทางตรงข้ามทำให้ของเหลวภายนอกเซลล์มีค่า osmotic pressure เพิ่มขึ้น และเพื่อเป็นการปรับสมดุลความเข้มข้นของตัวถูกละลายและตัวทำละลายระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อ จึงมีการเคลื่อนย้ายของน้ำจากภายในเซลล์ไปสู่ภายนอกเซลล์ เป็นผลให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดโตขึ้นและเกิดการหดตัวของเส้นใยโปรตีน (Reid, 1997; Fennema, Powrie and Marth, 1973) ดังนั้นอัตราเร็วของการแช่เยือกแข็งควรมีความเร็ว

เพียงพอ ที่จะป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายนอกเซลล์ ในการแช่เยือกแข็งแบบเร็วมีการดึงความร้อนออกจากผลิตภัณฑ์อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นทั้งภายในและนอกเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงไม่เกิดการ osmosis อย่างไรก็ตามการแช่เยือกแข็งอย่างรวดเร็วบางครั้งพบว่าทำให้เกิดการเสียหายของเนื้อเยื่อและมีผลต่อระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (Grujic et al., 1993; Pan and Yeh, 1993) ซึ่งเป็นผลการขยายตัวจากการเพิ่มปริมาตรของน้ำที่อยู่ภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสถานะของน้ำจากของเหลวไปเป็นผลึกน้ำแข็งจึงทำให้เกิดรอยแยกระหว่างเซลล์ขึ้น

2.12.3 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสภาพแช่แข็ง

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสภาพแช่แข็ง เป็นผลเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทางชีวเคมี ถึงแม้ว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C ก็ไม่สามารถหยุดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ ปฏิกิริยาการเสื่อมเสียทางชีวเคมีจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และยังคงดำเนินไปอย่างต่อเนื่องเพราะว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวยังคงมีน้ำบางส่วนในเนื้อเยื่อที่ไม่เปลี่ยนเป็นผลึกน้ำแข็ง ทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นรวมทั้งการสูญเสียสภาพธรรมชาติโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าสาเหตุสำคัญของการเสื่อมเสียยังมาจากการเปลี่ยนแปลงของผลึกน้ำแข็งและการทำงานของเอนไซม์ (Xiong, 1997; Sista, Erickson, and Shewfelt, 1997; Erickson, 1997)

การเสื่อมเสียคุณภาพของผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งในช่วงการเก็บรักษามักเป็นการสูญเสียคุณภาพในด้านกายภาพและเคมี (Botta, 1994; Reid, 1997) ได้แก่

2.12.3.1 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

1. การเปลี่ยนแปลงของผลึกน้ำแข็ง สาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งมีสาเหตุจากการตกผลึกน้ำแข็งใหม่ การตกผลึกใหม่หมายถึง การเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่เกี่ยวกับจำนวน ขนาด รูปร่าง และการเรียงตัวของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นหลังจากที่ได้ผ่านการกลายเป็นผลึกที่สมบูรณ์แล้ว (Fennema, Powrie and Marth, 1973; Fellows, 1990; Pham, and Mawson, 1997) ชนิดของการตกผลึกใหม่ที่สำคัญที่สามารถเกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งระหว่างการเก็บรักษา ได้แก่

1.1 migratory recrystallization เป็นลักษณะการเพิ่มขึ้นของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจากการเคลื่อนที่ของน้ำ เนื่องจากความแตกต่างของค่าความดันไอน้ำที่มีสาเหตุมาจากการหลอมตัวของผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็ก < 2 μm หรือการหลอมตัวบางส่วนของผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่ > 2 μm โดยโมเลกุลของน้ำจะเคลื่อนที่จากที่ความดันสูงไปยังความดันไอที่ต่ำกว่าและไปเกาะบนผิวของน้ำแข็งที่ยังคงอยู่ทำให้ผลึกน้ำแข็งขยายขนาดขึ้น ทำให้จำนวนของผลึกลดลง และพลังงานผิวหน้าของผลึกก็จะลดลงด้วย ที่อุณหภูมิและความดันคงที่พบว่าการตกผลึกใหม่แบบนี้เป็นผลมาจากความแตกต่างของพลังงานผิวหน้า ระหว่างผลึกขนาดใหญ่และผลึกขนาดเล็ก กล่าวคือผลึกที่มีขนาดเล็กจะมีรัศมีส่วนโค้งน้อยกว่า จึงไม่สามารถจับโมเลกุลที่ผิวหน้าได้แน่นหนาเท่ากับผลึกขนาดใหญ่ ดังนั้นผลึกขนาดเล็กจึงมีสมบัติในการละลายสูงกว่าผลึกขนาดใหญ่ การตกผลึกใหม่แบบนี้เกิดขึ้นได้เมื่ออุณหภูมิในช่วงการเก็บรักษาอาหารแช่เยือกแข็งไม่คงที่

1.2 Accretive recrystallization เป็นการตกผลึกใหม่เนื่องจากผลึกน้ำแข็งที่สัมผัสกัน สามารถที่จะรวมตัวเข้าด้วยกัน ซึ่งมีผลให้ขนาดผลึกน้ำแข็งเพิ่มขึ้น แต่มีจำนวนผลึกลดลง และพลังงานผิวหน้าของผลึกก็จะมีค่าลดลงด้วย และเนื่องจากอาหารแช่เยือกแข็งมีผลึกน้ำแข็งเป็นจำนวนมากพอที่จะสัมผัสกัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าจะเกิดการตกผลึกแบบนี้เกิดขึ้น

1.3 Isomass recrystallization หมายถึงการเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่เกิดบนผิวหน้า หรือภายในโครงสร้างของผลึก เมื่อผลึกเคลื่อนที่ไปยังระดับพลังงานที่ต่ำกว่า การตกผลึกใหม่แบบนี้เกิดขึ้นเมื่อผลึกมีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ และเมื่ออัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของผลึกมีค่ามากกว่า

Ngapo และคณะ (1999) พบว่าการเก็บรักษาเนื้อหมูไว้ในสภาพแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากการตกผลึกใหม่ และยังพบว่าการโตของผลึกน้ำแข็งมีผลต่อการเสียหายของเซลล์มากขึ้น

Chen และ Pan (1997) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกล้ามเนื้อของปลานิลหลังจากแช่เยือกแข็งด้วย air blast ที่อุณหภูมิ -36 °C โดยมีอัตราเร็วของการแช่เยือกแข็งเท่ากับ 1.5 cm/hr และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C พบว่าระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 3.5 เป็น 27.7 μm เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 และ 2 เดือน ตามลำดับ และเมื่อเก็บนานขึ้นเป็นเวลา 6 เดือน ระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อยิ่งเพิ่มขึ้น และยังพบว่ามีการเสียหายและการฉีกขาดของกล้ามเนื้อมากขึ้น

2.12.3.2 การเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

การเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษาสัตว์น้ำไว้ในสภาพแช่เยือกแข็ง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีน เช่น คุณสมบัติการละลาย โครงสร้างของโปรตีน และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน และเป็นผลให้มีการเสื่อมเสียคุณภาพของสัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง โดยเฉพาะการเสื่อมเสียคุณภาพของเนื้อสัมผัส (Jiang and Lee, 1985 ; Jiang et al., 1991 ; Huidobro, MoHamed and Tejada, 1998; Ramirez, Martin-Polo and Bandman, 2000) ปัจจัยที่มีผลต่อการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีนสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ปัจจัย ได้แก่

1. การเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เนื่องจากการแช่เยือกแข็งทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมทางสมบัติเคมีและกายภาพของโปรตีนในเนื้อเยื่อ โดยสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพธรรมชาติของโปรตีน ทำให้โปรตีนมีสมบัติเปลี่ยนไป (Tolstoguzov, 1993 ; Xiong, 1997) เช่น สมบัติการละลายลดลง การทำงานของเอนไซม์ลดลง มีเสถียรภาพต่อความร้อนลดลงหรือมีความไวต่อการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากความร้อนมากขึ้น และการสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เป็นต้น โดยมีปัจจัยชักนำของการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากการแช่เยือกแข็ง (Taub and Singh,1997) ดังนี้

1.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือหรืออิออน โปรตีนกล้ามเนื้อสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามคุณสมบัติการละลาย (Bandman, 1987; Pearson and Young, 1989; Kijowski, 2001) ได้แก่ โปรตีนซาร์โคพลาสมิคเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติละลายน้ำหรือในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำๆ โปรตีนที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ และ myoglobin โปรตีนที่มีสมบัติละลายได้ในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นสูง (0.3-1.0 M NaCl) หรือเรียกว่าโปรตีน myofibrillar โปรตีนที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ ไมโอซิน และโปรตีน stroma เป็นโปรตีนที่ไม่สามารถละลายน้ำหลังจากการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายเกลือแล้ว

ขณะที่มีการแช่เยือกแข็งเกิดขึ้นทำให้เกลือแร่ต่างๆ ที่ละลายอยู่ในส่วนของน้ำที่ไม่แข็งตัวภายในเซลล์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของค่า ionic strength และค่าความเป็นกรดด่างทำให้มีผลต่อการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (Xiong, 1997) โดยทั่วไปโปรตีนมีคุณสมบัติการละลายได้เพิ่มขึ้น (salting-in) เมื่อค่า ionic strength ต่ำ (0.3-1.0 M NaCl) แต่เมื่อค่า ionic strength สูงทำให้มีการแข่งขันของแรงอิเลคโตรสเตติคระหว่างอิออนของเกลือและน้ำกับโปรตีนเป็นผลให้เกิด salting-out เนื่องจากแรงอิเลคโตรสเตติค

ระหว่างน้ำกับโปรตีนลดลง หรือในทางกลับกันคือทำให้โปรตีนมีคุณสมบัติการละลายลดลง นอกจากนี้ผลของตัวถูกละลายที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ยังอาจมีผลต่อการเหนี่ยวนำโปรตีนให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและทำให้โปรตีนสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น คุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ Ca^{2+}ATPase

1.2 การสูญเสียน้ำของเซลล์ ในสภาวะที่เซลล์มีการสูญเสียน้ำเกิดขึ้นทำให้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโมเลกุลของน้ำถูกขัดขวาง และโมเลกุลของโปรตีนสัมผัสกับสภาพแวดล้อมที่เป็น organic ซึ่งมี polar น้อยกว่าน้ำ เป็นผลให้มีการเปิดพันธะของไฮโดรโฟบิคออกมามากขึ้น และเป็นเหตุให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูป

นอกจากนี้ยังพบว่าผลของการเกิดปฏิกิริยา auto oxidation ยังเป็นสาเหตุให้โปรตีนเกิดการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติและสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เนื่องจากเกิดการเชื่อมข้ามระหว่างโปรตีนกับผลิตผลที่เกิดจากปฏิกิริยา lipid oxidation มีผลรบกวนปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับตัวทำละลาย ทำให้โมเลกุลของโปรตีนสัมผัสกับสภาพแวดล้อมหรือ organic environment ที่มีขั้วน้อยกว่าน้ำ ทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวและเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

Jiang และ Lee (1985) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการละลายของโปรตีนกล้ามเนื้อในปลาน้ำจืด crap (*Cyprinus carpino*) ปลาน้ำเค็ม mackerel (*Scomber tapeinocephalus*) และปลา amberfish (*Qecapterus marudasi*) และปลาน้ำกร่อย mullet (*Mugil cephalus*) ระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง โดยนำเนื้อปลามาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18 °C แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผลที่ได้พบว่าปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินในทุกตัวอย่างมีค่าลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น (12 สัปดาห์) โดยมีปริมาณแอคโตไมโอซินที่สามารถละลายได้คิดเป็นร้อยละเทียบกับเนื้อปลาสด (100%) ดังนี้ mackerel (46%) mullet (51.1%) amberfish (64.2%) carp (70.7%)

Awad, Powrie และ Fennema (1969) พบว่าการแช่เยือกแข็งปลาน้ำจืด whitefish (*C. clupeiformis*) ที่อุณหภูมิ -10 °C นาน 18 ชั่วโมง และนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -10 °C นาน 16 สัปดาห์ ปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินลดลงจากร้อยละ 71.91 เป็น 21.92 เมื่ออายุการเก็บรักษาเป็น 0 และ 16 สัปดาห์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งหมดใน thaw drip พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 8.74 % เป็น 19.60 % ที่ 16 สัปดาห์ โดยสัมพันธ์กับปริมาณ thaw drip ที่เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 19 % เป็น 34.5 % เมื่ออายุการเก็บรักษานาน 16 สัปดาห์

Jiang และคณะ (1991) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพธรรมชาติของโปรตีนในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง (-20 °C) พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเป็น 6 เดือน การละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซินมีค่าลดลงจากเริ่มต้น 92.3 เป็น 67.0 mg/g เนื่องจากการรวมตัวของโปรตีนไมโอซิน นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ Ca^{2+}ATPase มีค่าลดลงจากเริ่มต้น 1.082 เป็น 0.608 μmole Pi/min/mg เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนไมโอซินที่ตำแหน่ง catalytic center ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสับเสตรทได้

2. การเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เนื่องจากการถูกย่อยสลายของโปรตีนหรือการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีน ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีน และทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพเนื้อสัมผัสด้อยลง (Haard, 1994; Ashie and Simpson, 1997) โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Baranoski, Nip และ Moy (1984); Nip, Lan และ Moy (1985) ที่พบว่ามีความสัมพันธ์ของการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ย่อยโปรตีนกับคุณภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อ แหล่งเอนไซม์ที่สำคัญมาจากตัวสัตว์น้ำเอง โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ คือ กลุ่มเอนไซม์ที่อยู่ในกล้ามเนื้อ เอนไซม์ที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ cathepsins และ calpains กลุ่มเอนไซม์ที่อยู่ระหว่าง extracellular matrix ของกล้ามเนื้อ ได้แก่ collagenases และกลุ่มเอนไซม์ที่อยู่ในระบบย่อยอาหารและอวัยวะอื่นๆ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ pepsin, chymotrypsin และ collagenases เป็นต้น สำหรับในกุ้งพบเอนไซม์คาเทปซิน B, D และ D-like activity (Ashie and Simpson, 1997) และ serene proteases หรือ collagenases นอกจากแหล่งของเอนไซม์ที่กล่าวมาแล้ว ยังพบว่ามีแหล่งของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับสัตว์น้ำ

2.12.4 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการละลายผลึกน้ำแข็ง

การเปลี่ยนแปลงระหว่างการละลายน้ำแข็งออก เป็นขั้นตอนที่ค่อนข้างซับซ้อนและอาหารมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงอุณหภูมิใกล้จุดเยือกแข็งและจะคงอยู่ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลานาน เป็นผลให้ปฏิกิริยาต่างๆ ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นได้ในอัตราเร็วที่สูง นอกจากนี้ยังมีการสูญเสียของเหลวออกจากเนื้อเยื่อ และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพธรรมชาติของโปรตีนโดยขึ้นกับวิธีการละลายน้ำแข็งออกจากผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง (Reid, 1997; Srinivasan et al.,1997)

วิธีการละลายน้ำแข็งมีหลายวิธี ได้แก่ การใช้น้ำไหลผ่าน การใช้กระแสไฟฟ้าผ่านแผ่นขั้วไฟฟ้า และการใช้ไมโครเวฟ สำหรับวิธีการใช้น้ำไหลผ่านจะเป็นวิธีที่สะดวกและเป็นที่นิยมใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าใช้ระยะเวลาในการละลายน้ำแข็งไม่นานมากนักและไม่มีผลต่อการเสื่อมเสียคุณภาพทั้งทางด้านจุลินทรีย์ และการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีน (Srinivasan et al., 1998)

การละลายน้ำแข็งและการแช่เยือกแข็งซ้ำ (freeze-thaw cycles) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง โดยพบว่าในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachuim rosenbergii*) ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งซ้ำกันหลายๆครั้ง โดยการแช่เยือกแข็งด้วย still freezer ที่อุณหภูมิ -29 °C นาน 2 ชั่วโมง และละลายน้ำแข็งด้วยวิธีการใช้น้ำหมุนเวียนที่อุณหภูมิ 22 °C นาน 30 นาที จากนั้นแบ่งกุ้งที่ผ่านการละลายน้ำแข็งแล้วมาต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที พบว่าแรงเฉือนที่ใช้ตัดตัวอย่างให้ขาดออกจากกันของกุ้งดิบหลังจากผ่านการละลายน้ำแข็งและแช่เยือกแข็งซ้ำ 5 ครั้งไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่กุ้งต้มมีค่าแรงเฉือนลดลงหลังจากผ่านการละลายน้ำแข็งและแช่เยือกแข็งซ้ำ 3 ครั้ง ผู้วิจัยได้อธิบายว่าเป็นผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการต้มกุ้งทำให้มีการเร่งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนไมโอซิน แอคติน และ myofibrillar ลดลงเล็กน้อยเมื่อผ่านการละลายน้ำแข็งและแช่เยือกแข็งซ้ำหลายๆครั้ง รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้านพลังงานความร้อน (enthalpy) ของโปรตีนเนื่องจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการแช่เยือกแข็ง โดยพบว่าค่า enthalpy ของกุ้งที่ไม่ผ่านการต้มมีค่าลดลงจาก 16.6 เป็น 13.5 j/g หลังจากผ่านการละลายน้ำแข็งและแช่เยือกแข็งซ้ำ 1 ครั้ง และหลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (Srinivasan et al., 1997)

Hurling และ McArthur (1996) ได้ศึกษาการนำเนื้อปลาคอด (*Gadus morhua*) มาแช่เยือกแข็งด้วย air blast ที่อุณหภูมิ -30 °C แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -22 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นละลายน้ำแข็งออกด้วยน้ำไหลผ่าน(อุณหภูมิน้ำ 18 °C เป็นเวลานาน 45 นาที) และนำไปแช่เยือกแข็งซ้ำใหม่ (1 รอบ) พบว่ากล้ามเนื้อปลาคอดมีการเสียหายเนื่องจากแรงกดของผลึกน้ำแข็ง ซึ่งเป็นผลมาจากการสูญเสียน้ำของเซลล์เนื่องจากการแช่เยือกแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน myofibrillar มีการละลายและคุณสมบัติการอุ้มน้ำลดลง