บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ปลานิล

ปลานิล (Nile tilapia) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งอยู่ในตระกูล Cichidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* Linn ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในแม่น้ำไนล์ทวีปแอฟริกาตะวันตก แต่มีการแพร่กระจายไปสู่ทั่วทุกภูมิภาคของโลก เนื่องจากเป็นพันธุ์ปลาที่เลี้ยงง่าย มีความแข็งแรงอดทน สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เจริญเติบโตรวดเร็ว และสามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้เองในธรรมชาติ จึงทำให้ปลานิลกลายเป็นพันธุ์ปลาที่นิยมเพาะเลี้ยงกันทั้งในประเทศและต่างประเทศ

ปลานิลมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับปลาหมอเทศ ลำตัวสั้น แบนข้าง ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่ 1 จุด ซึ่งสีของลำตัวจะเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมตั้งแต่สีดำอ่อนจนถึงสีเขียวดำ ท้องสีขาว ที่ลำตัวมีลายพาดขวางประมาณ 9-10 แถบ ซึ่งเพศเมียจะมีสีจางกว่าเพศผู้มาก ครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางมีจุดสีขาวและเส้นสีดำตัดขวางดูคล้ายลายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไปซึ่งบนแถบเส้นข้างลำตัวมีเกล็ด 33 เกล็ด ครีบหลังมีอันเดียวยาวจรดถึงคอดหาง ซึ่งประกอบไปด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อนจำนวนมาก ครีบก้นประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อน ครีบหางตัดตรง (สุวรรณ วิรัชกุล 2544; อุดม เรืองนพคุณ 2549)

2. องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลานิล

เนื้อปลานิลให้โปรตีนมากกว่าเนื้อไก่ และ เนื้อหมูเกือบเท่าตัว ซึ่งเนื้อปลานิลมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 18.2-21.5 เนื้อไก่ไม่มีหนังมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 16.0-18.0 ส่วนหมูเนื้อแดงมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 14.1 ซึ่งเนื้อปลานิลเป็นโปรตีนที่คนเราย่อยและดูดซึมได้ถึงร้อยละ 96 ตลอดจนมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย มีแคลเซียมและฟอสฟอรัสมากกว่าเนื้อสัตว์อื่นๆ นอกจากนี้ยังมีปริมาณไขมันต่ำกว่าถึง 30 เท่า นั่นคือ เนื้อปลานิลมีไขมันร้อยละ 0.1-2.2 ในขณะที่เนื้อไก่ไม่มีหนังมีไขมันร้อยละ 25.0-28.6 ส่วนหมูเนื้อแดงมีไขมันร้อยละ 35.0 ซึ่งกรดไขมันในไขมันจากเนื้อปลานิลเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (สุวรรณ วิรัชกุล 2544)

Gonzales and Brown (2006) ได้ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของปลานิล (Nile tilapia) สายพันธุ์ *Oreochromis niloticus* โดยเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของปลาทั้งตัว (whole body) เนื้อปลาแล่ (fillet) และซากปลาที่เหลือ (carcass residues) จากผลการวิจัยพบว่า ปริมาณคาร์บอนและสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างทั้งสามแบบมีความคล้ายคลึงกันซึ่งพบว่า ปลาทั้งตัวมีปริมาณคาร์บอนร้อยละ 53.76 และปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนร้อยละ 6.96 เนื้อปลาแล่มีปริมาณคาร์บอนร้อยละ 47.06 และ ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนร้อยละ 6.75 และซากปลามีปริมาณคาร์บอนร้อยละ56.36 และปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนร้อยละ 7.04 ในขณะที่เนื้อปลาแล่มีปริมาณไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และโปรตีนร้อยละ 13.34 1.34 และ 83.37 ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณที่มากที่สุดซึ่งมากกว่าปลาทั้งตัวที่มีปริมาณ

ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และโปรตีนร้อยละ 9.27 0.62 และ 57.97 ตามลำดับ และซากปลาที่มีปริมาณไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และโปรตีนร้อยละ 7.70 0.39 และ 48.15 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปลานิลทั้งตัว และเนื้อปลานิลแล่ เป็นแหล่งอุดมสมบูรณ์ของ โปรตีน วิตามินดี กรดแอสคอร์บิก ธาตุซีลีเนียม ซึ่งสารอาหารเหล่านี้จำเป็นต่อการทำงานของร่างกาย และปลาทั้งตัวเป็นแหล่งโภชนาการที่ดีของไขมัน กรดไขมันจำเป็น (linolenic:ω3) แคลเซียม และฟอสฟอรัส ซึ่งดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อปลาแล่

3. ความหมายของเนื้อปลาบด

เนื้อปลาบด หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำปลามาแยกเอาส่วนหัวและเครื่องในออก แล้วนำเข้าเครื่องแยกเนื้อปลา (meat separator) หรือ จากการแล่เนื้อปลา (filleting) แล้วนำชิ้นเนื้อปลาแล่ (fillets) ไปเข้าเครื่องแยกเนื้อปลาออกจากก้างและหนังปลา ดังนั้นเนื้อปลาบดที่ได้จึงมีองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ รวมทั้งสีและกลิ่นรสเหมือนกับเนื้อปลาปกติ ซึ่งจะใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการทำซูริมิ เนื้อปลาบดนี้สามารถนำไปประกอบอาหารต่างๆ ได้ทันที หรือ ใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อปลา เช่น ลูกชิ้น ไส้กรอก fish stick และ fish cake เป็นต้น (สุวรรณ วิรัชกุล 2544)

4. โปรตีนปลา

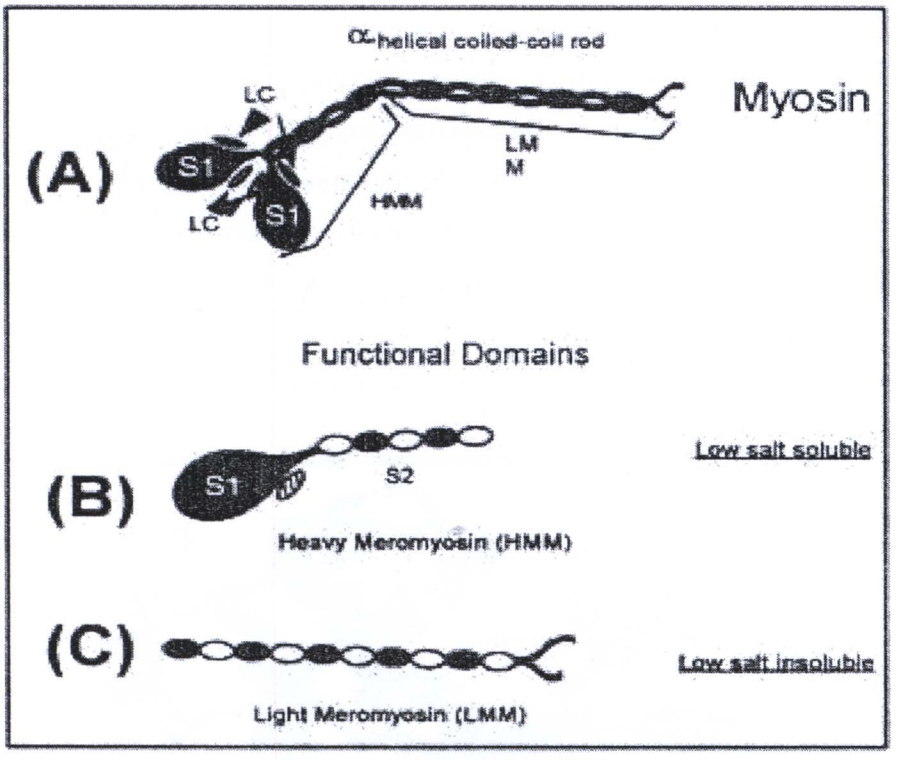
โปรตีนในกล้ามเนื้อปลาสามารถจำแนกได้เป็น 3 ชนิด (จักรี ทองเรือง 2544; สุวรรณ วิรัชกุล 2544; จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล 2549) ดังนี้

4.1 โปรตีนโครงสร้าง หรือโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ (structural or myofibrillar protein)

โปรตีนไมโอฟิบริลลาร์เป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของกล้ามเนื้อ (structural muscle) ทำหน้าที่ในการยืดและหดตัวของกล้ามเนื้อ (contractile proteins) ขณะปลายังมีชีวิตอยู่ ซึ่งโปรตีนนี้จะมีลักษณะเป็นเส้น (fibrous) มีคุณสมบัติละลายในสารละลายเกลือที่มีความเป็นกลางและมีความแรงอิออนอยู่ในช่วง 0.3-1.0 Debye ซึ่งความสามารถละลายในสารละลายเกลือของโปรตีนชนิดนี้พบว่า มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับระดับการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน นอกจากนี้โปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ยังมีคุณสมบัติในการเกิดเจลด้วยความร้อนสูง (high heat gelation properties) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะมีอยู่ประมาณร้อยละ 70-80 ของโปรตีนทั้งหมดและประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิด ไมโอซิน (myosin) เป็นโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ที่พบในปริมาณมากที่สุดมีอยู่ประมาณร้อยละ 55-60 ของโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ รองลงมาคือแอกติน (actin) มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-30 ของโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ ซึ่งเมื่อแอกตินและไมโอซินรวมตัวกันเป็นคอมเพล็กซ์ (complex) เรียกว่า แอกโตไมโอซิน (actomyosin) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนพวกโทรโปนินเชิงซ้อน (troponin complex) โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) แอกตินิน (actinin) เอ็ม-โปรตีน (M-proteins) และซี-โปรตีน (C-proteins) ซึ่งเป็นส่วนประกอบส่วนน้อยอยู่ด้วย

ไมโอซินเป็นโมเลกุลสายยาวขนาดใหญ่ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 500 กิโลดาลตัน (kilodalton) ประกอบด้วยโปรตีนสองหน่วยย่อย (subunit) คือ ไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain, MHC) 2 สาย และไมโอซินสายเบา (myosin light chain, LC) 4 หน่วยย่อย (ภาพที่ 1) MHC แต่ละสายประกอบด้วยส่วนหัวซึ่งมีรูปร่างเป็นก้อนกลม เรียกว่า globular head และส่วนหางซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์สายยาว 2 สายพันรอบซึ่งกันและกันเกิด

เป็นโครงสร้างแอลฟาฮีลิกซ์ (α-helix) ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่ง (rod shape) ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยแต่ละสายของ MHC มีขนาด 200 กิโลดาลตัน บริเวณ globular head สามารถแสดงกิจกรรมการย่อยสลาย adenosine triphosphate (ATPase activity) ทำให้เกิดพลังงานเพื่อใช้ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ ชื่อตามระบบ (systematic name) ของเอนไซม์ไมโอซินคือ ATP phosphohydrolase (EC 3.6.1.3) นอกจากนี้บริเวณ globular head ของไมโอซินมีความสามารถจับกับแอกติน (actin binding site) ซึ่งมีความสำคัญในระหว่างการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ สำหรับไมโอซินสายเบาจะมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ โดยแต่ละหน่วยมีขนาดอยู่ระหว่าง 16-27 กิโลดาลตัน



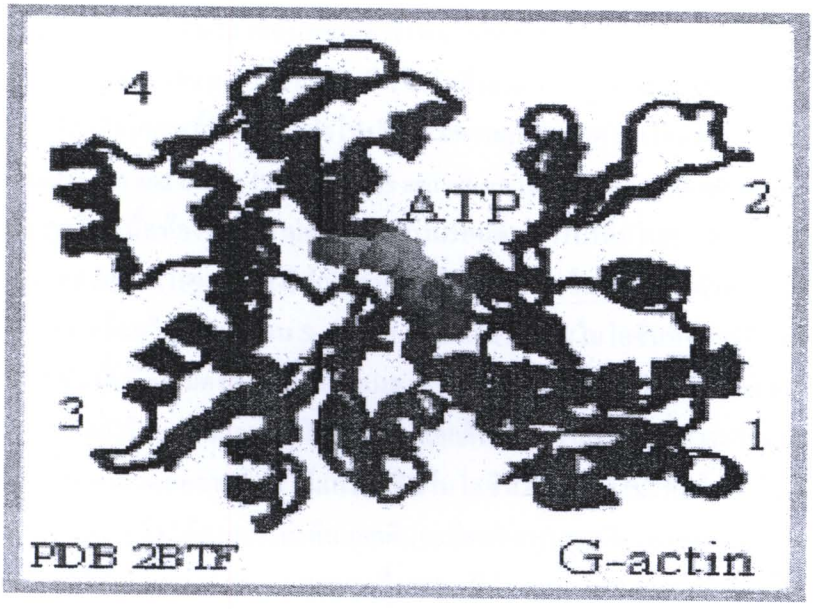
ภาพที่ 1 ภาพวาดไมโอซิน (A) และหน่วยย่อย heavy meromyosin (B) และหน่วยย่อย light meromyosin (C) S1=subfragment S1, S2= subfragment S2

ที่มา: Wick (2008)

เมื่อไมโอซินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) จะทำให้โครงสร้างไมโอซินถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ heavy meromyosin (HMM) ซึ่งประกอบด้วยส่วน globular head และส่วนต้นของ rod โปรตีน HMM สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือเจือจางดังแสดงในภาพที่ 1 ความสามารถในการละลายที่ต่างกันของ LMM และ HMM สามารถนำมาใช้ในการแยกสกัด LMM และ HMM ออกจากกันได้ เมื่อนำส่วนของ HMM มาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ปาเปน (papain) ได้ส่วนย่อย S-1 และ S-2 ซึ่งคือส่วน globular head และส่วน myosin rod ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

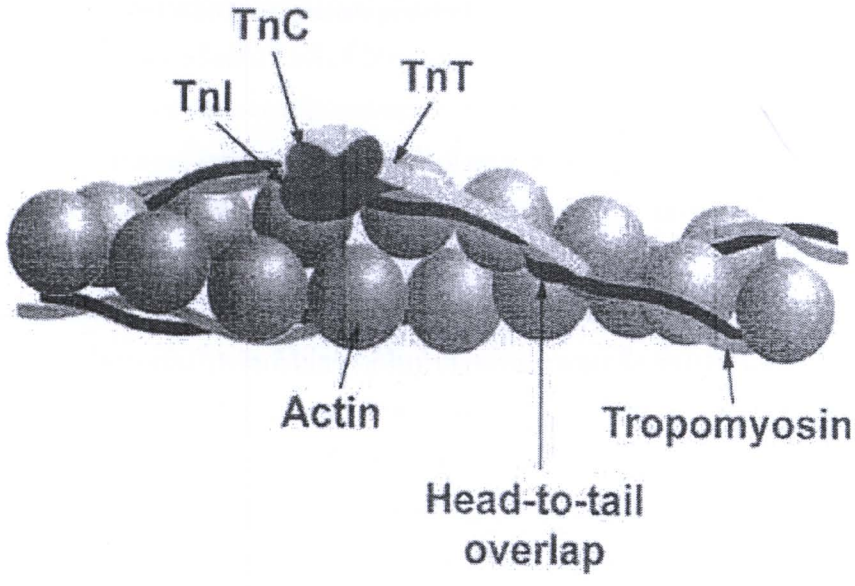
แอกตินมีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 22 ของโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ สายแอกตินประกอบด้วยหน่วยย่อย G-actin หรือ globular actin ซึ่งมีรูปร่างเป็นก้อนกลม (globular) และมีขนาด 43 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 2) G-actin ต่อเรียงตัวเป็นสายยาวประมาณ 500-600 หน่วย เกิดเป็นเส้นใย เรียกว่า F-actin หรือ fibrous actin ซึ่งจะพันเป็นเกลียวในลักษณะแอลฟาฮีลิกซ์ (ภาพที่ 3) การเชื่อมต่อกันของ G-actin เป็น F-actin นั้นจำเป็นจะต้องมีสภาวะที่เหมาะสม ในหลอดทดลองพบว่า G-actin จะเชื่อมโยงเป็นสายยาว (polymerization) ของ F-actin เมื่ออยู่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl) เข้มข้น 20-100 มิลลิโมลาร์ และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยพบว่าประจุของเกลือแคลเซียม (Ca^{2+}) หรือแมกนีเซียม (Mg^{2+}) มีส่วนช่วยเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมโยงดังกล่าว จากภาพที่ 2 จะเห็นว่า G-actin ประกอบด้วย 4 โดเมน (domain) คือโดเมน 1, 2, 3 และ 4 และมีบริเวณที่สามารถจับกับ ATP ซึ่งมีลักษณะเป็นแอ่ง (cleft) อยู่ระหว่างโดเมน 2 และ 4

โทรโปไมโอซินประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 2 สายซึ่งพันกันเป็นแอลฟาฮีลิกซ์ แต่ละสายประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 284 โมเลกุล พอลีเปปไทด์แต่ละสายมีขนาดประมาณ 34-36 กิโลดาลตัน โทรโปไมโอซินจัดเรียงตัวอยู่ที่สายแอลฟาฮีลิกซ์ของแอกตินบริเวณที่แอกตินจับตัวกับไมโอซินขณะที่เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อดังแสดงในภาพที่ 3 สำหรับโทรโปรนินเชิงซ้อนประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ โทรโปนิน-ซี (troponin-C) ซึ่งทำหน้าที่จับกับ Ca^{2+} ขณะเกิดการยืดตัวของกล้ามเนื้อซึ่งมีขนาด 17-18 กิโลดาลตัน โทรโปนิน-ไอ (troponin-I) คือส่วนที่ยับยั้งการจับตัวรวมกันระหว่างแอกตินและไมโอซิน และมีขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตัน และโทรโปนิน-ที (troponin-T) ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมโยงโทรโปไมโอซินและแอกติน ซึ่งมีขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 2 ภาพวาดโครงสร้างจี แอกติน ตัวเลขแสดงโดเมน

ที่มา: Anonymous (2008)



ภาพที่ 3 ภาพวาดแสดงการจัดเรียงตัวของเอฟ-แอกติน โทรโปไมโอซินและโทรโปนิน
ที่มา: Young (2008)

โปรตีนไมโอซินจากสัตว์น้ำมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนของกล้ามเนื้อสัตว์อื่นๆ การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซินจากปลาจึงพบว่าเกิดขึ้นได้อย่างช้าๆ แม้ว่าจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ระดับความคงตัวต่อความร้อนของโปรตีนไมโอซินยังแตกต่างไปตามชนิดของปลาและชนิดของกล้ามเนื้อ โดยปลาที่จับได้จากเขตที่มีอุณหภูมิต่ำโปรตีนจะมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนในปลาที่จับได้จากเขตร้อน (Hashimoto and others 1982; Rodgers and others 1987; Jimenez-Colmenero and others 1994) และโปรตีนที่ได้จากกล้ามเนื้อท้องจะมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนในกล้ามเนื้อสัน Lin and Wang (1998) และ Ogawa and others (1994) แสดงให้เห็นว่าการที่โปรตีนไมโอซินมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำนั้นเป็นผลมาจากการทนต่อความร้อนได้ต่ำของส่วน S-1 และ LMM ทั้งนี้โปรตีนไมโอซินที่จับอยู่กับแอกตินในรูปของโปรตีนแอกโตไมโอซินนั้นมีความคงตัวต่อความร้อนสูงกว่าเมื่ออยู่ในรูปอิสระโดยเป็นผลจากการที่โปรตีนทั้งสองต่างช่วยเพิ่มความคงตัวให้แก่กันและกัน โดยโปรตีนแอกตินซึ่งมีความคงตัวต่อความร้อนสูงกว่าโปรตีนไมโอซินจะช่วยเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนให้แก่โปรตีนไมโอซินในขณะที่โปรตีนไมโอซินซึ่งละลายได้ในสารละลายเกลือและทนต่อเกลือได้สูงกว่าโปรตีนแอกตินจะป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนแอกตินจากสารละลายเกลือ (Torigai and Konno 1996) ซึ่งความเข้าใจต่อความคงตัวของโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์นี้สามารถนำไปใช้เตรียมเจล ของโปรตีนได้ เช่น การใช้เกลือเพื่อทำให้โปรตีนแอกโตไมโอซินแยกตัวเป็นโมเลกุลอิสระ และเมื่อโปรตีนไมโอซินที่แยกออกจากแอกตินมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำก็จะสามารถเตรียมเจลได้ที่อุณหภูมิต่ำก็จะสามารถเตรียมเจลได้ที่อุณหภูมิต่ำลง (Park and Lanier 1989)

4.2 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic proteins)

โปรตีนซาร์โคพลาสมิกเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลม (globular proteins) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำหรือสารละลายเกลือที่มีความแรงของอิออนต่ำกว่า 0.15 Debye มีคุณสมบัติในการเกิดเจลด้วยความร้อนต่ำ ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีอยู่ประมาณร้อยละ 20-25 ของโปรตีนทั้งหมด ส่วนใหญ่จะอยู่ในกล้ามเนื้อแดง (red or dark muscle) ประกอบไปด้วยโปรตีนอัลบูมิน (albumin), โกลบูลิน (globulin), ไมโอโกลบิน (myoglobin) และเอนไซม์ (enzyme)

4.3 โปรตีนสโตรมา หรือโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (stroma or connective tissue proteins)

โปรตีนสโตรมาเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในน้ำหรือสารละลายเกลือ ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีอยู่ร้อยละ 3-5 ของโปรตีนทั้งหมด ไม่มีคุณสมบัติในการเกิดเจล มีคอลลาเจน (collagen) เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อให้ความร้อนแก่คอลลาเจนจะทำให้คอลลาเจนละลายไปเป็นเจลลาติน (gelatin) และอาจเข้าไปแทรกแซงการเกิดเจลของโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ แต่ในกล้ามเนื้อปลามีโปรตีนสโตรมาน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ ดังนั้นจึงมีผลน้อยมากต่อความสามารถในการเกิดเจลของโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์

5. กระบวนการเกิดเจลของกล้ามเนื้อปลา

เจลจัดเป็นวัฏภาคที่มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างของแข็งและของเหลว โครงสร้างของเจลโปรตีนเกิดจากโมเลกุลของโปรตีนจับกันด้วยพันธะชนิดต่างๆ เป็นโครงตาข่าย 3 มิติที่สามารถจับน้ำหรือสารอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายในได้ (Damodaran 1996)

คุณสมบัติในการเกิดเจล (gelation properties) เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของโปรตีนจากกล้ามเนื้อปลาซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพของเนื้อปลา เจลที่แข็งแรงต้องอาศัยโปรตีนที่มีคุณภาพสูง ตลอดจนปฏิบัติการ และการให้ความร้อนที่เหมาะสม การเกิดเจลเป็นกลไกทางเคมีที่เกิดจากการเชื่อมของโปรตีนไมโอไฟบริลด้วยพันธะต่างๆ และอาจมีเอนไซม์บางชนิดเร่งการเชื่อมประสานของโปรตีนและให้โครงข่ายของโปรตีนที่แข็งแรง โดยกระบวนการเกิดเจลจะเริ่มจากขั้นตอนการแตกตัวของโปรตีนไมโอไฟบริลก่อนจากนั้นจะเป็นขั้นตอนในการเกิดเจลซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

5.1 การแตกตัวของโปรตีนไมโอไฟบริล

โปรตีนไมโอไฟบริลเป็นโปรตีนกล้ามเนื้อที่มีส่วนสำคัญในการเกิดเจล ซึ่งการเกิดเจลสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 2-3 ภายใต้สภาวะนี้โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและไอออน (โซเดียมและคลอไรด์ไอออน) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวประกอบไปด้วย (Xiong 1997)

5.1.1 การบวม (Swelling) ของไมโอไฟบริล เนื่องจากแรงผลักของประจุระหว่างเส้นใยโปรตีน (myofilament)

5.1.2 การแยก (depolymerization) ของเส้นใยโปรตีน

5.1.3 การแยกของแอกตินจากไมโอซิน หรือการแยกของแอกโตไมโอซินจากโครงสร้างไมโอไฟบริล

โปรตีนไมโอไฟบริลสามารถละลายได้โดยการเติมเกลือ ซึ่งไมโอซินที่ละลายสามารถรวมตัวกับแอกตินเกิดเป็นแอกโตไมโอซิน ซึ่งไมโอซินและแอกโตไมโอซินมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเจล แอก

ตินอาจมีผลเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะการเกิดเจลของไมโอซินในปลาบางชนิด แต่โทรโปไมโอซินจะมีผลต่อการเกิดเจล อย่างไรก็ตามไมโอซินเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญที่สุดในการเกิดเจล

กรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 50 จัดเป็นกรดอะมิโนชนิดไฮโดรฟิลิก ซึ่งร้อยละ 80 ของกรดอะมิโนนี้เป็นชนิดเบซิกและเอซิด กรดอะมิโนเหล่านี้จะอยู่บริเวณพื้นผิวของโปรตีน ซึ่งสามารถจับกับน้ำได้ ณ ความเป็นกรดด่างภายหลังจากการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อปลา หมู่คาร์บอกซิลของกลูตามิกและแอสพาร์ติกจะมีประจุลบ ในขณะที่หมู่อะมิโนของไลซีนและอาร์จินีนมีประจุบวก ดังนั้นแรงยึดระหว่างประจุของหมู่ดังกล่าว (salt linkage) สามารถเกิดขึ้น และโปรตีนไมโอไฟบริลสามารถจับเรียงตัวกันเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น (aggregate) ส่งผลให้ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่เมื่อเติมเกลือ ไอออนของเกลือสามารถจับกับประจุตรงกันข้ามบนพื้นผิวของโปรตีน

Protein – coo…$^{+}H_3N$ - Protein (ไม่ละลายน้ำ)

+NaCl

Protein – coo…Na^{+} Cl^{-}…$^{+}H_3N$ – Protein (ละลายน้ำ)

เพราะฉะนั้นแรงยึดระหว่างประจุของกรดอะมิโนระหว่างโมเลกุลของโปรตีนไมโอไฟบริลถูกทำลายและโปรตีนสามารถละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น โมเลกุลของไมโอซินและแอกโตไมโอซินจะมีสภาพเปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับค่า ionic strength เมื่อค่า ionic strength ต่ำ (< 0.3 M) ในช่วงความเป็นกรดด่างเป็นกลาง พบว่า โมเลกุลของไมโอซินมีลักษณะเป็นฟิลาเมนท์ (filament) แต่เมื่อค่า ionic strength สูงขึ้น (>0.3 M) โมเลกุลของไมโอซินจะกระจายตัวแยกออกจากกัน และอยู่ในลักษณะโมโนเมอร์ (monomer)

นอกจากเกลือสามารถเพิ่มการละลายของโปรตีนแล้ว ยังมีผลลดความคงตัวของโครงสร้างโมเลกุลต่อการสูญเสียสภาพโดยความร้อน (thermal denaturation) Wu and others (1985) รายงานว่า อุณหภูมิทรานสิชัน (transition temperature) ของซูริมิลดลงเมื่อเติมเกลือ และปริมาณเอนทาลปีที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนจะลดลง ดังนั้นโปรตีนจึงเกิดการสูญเสียสภาพได้ง่ายขึ้นภายหลังการเติมเกลือ

ปริมาณเกลือที่เติมลงในซูริมิมีผลต่อสมบัติของเจลซูริมิ Huang and others (1998) พบว่าปริมาณเกลือมีผลต่อความแข็งแรง (strength) และความยืดหยุ่น (deformation) ของเจลซูริมิจากปลานิลโดยการเติมเกลือในช่วงร้อยละ 2-3 ให้สมบัติของเจลไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการเติมเกลือต่ำกว่าร้อยละ 2 ให้เจลที่มีความแข็งแรงต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากเกลือที่ระดับความเข้มข้นที่เพียงพอสามารถละลายโปรตีนไมโอไฟบริล ซึ่งเป็นความจำเป็นพื้นฐานต่อการเกิดเจล

5.2 การเกิดเจล (gelation)

การเกิดเจลของโปรตีนสามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ (Connell 1960)

5.2.1 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (denaturation)

การเปลี่ยนแปลงโครงร่างโมเลกุลของโปรตีนซึ่งมักจะเป็นผลจากการได้รับความร้อน หรือเกิดจากโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติไปบางส่วนด้วยปัจจัยอื่น เมื่อเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเกิดขึ้นจะพบว่าความหนืดของระบบโปรตีนเพิ่ม เนื่องจากขนาดโมเลกุลโปรตีนใหญ่ขึ้นซึ่งเป็นผลจากการคลายตัวของโมเลกุลร่วมกับการเริ่มจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนบางส่วนที่คลายตัวออกมา

Ko and others (2007) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอกโตไมโอซินที่สกัดได้จากปลานิล *(Oreochromis niloticus)* โดยผ่านการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหมู่ซัลฟไฮดริล โดยให้ความร้อนในช่วง 25 ถึง 95 °ซ. จากนั้นนำไปสังเกตภายใต้กล้องอิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM) วิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลโดยใช้ SDS-PAGE ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลอิสระ (reactive sulfhydryl; R-SH) และปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด (total sulfhydryl; T-SH) จากการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 42 และ 45 °ซ พบปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลอิสระของแอกโตไมโอซินมากกว่าที่อุณหภูมิอื่นและลดลงร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 95 °ซ และพบว่าปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดของแอกโตไมโอซินลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อุณหภูมิช่วยกระตุ้นการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน การให้อุณหภูมิจนถึง 45 °ซ. ทำให้แอกโตไมโอซินคลายตัว (unfolding) โดยปราศจากการฟอร์มพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ที่อุณหภูมิ 55 และ 65 °ซ. จะเกิดการฟอร์มพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลของแอกโตไมโอซินและเกิดการจับเรียงตัวกัน (aggregation) และพบว่าโมเลกุลที่ใหญ่กว่าไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain) เกิดการจับเรียงตัวกันที่อุณหภูมิ 75 °ซ. การเสียสภาพของแอกโตไมโอซินขึ้นกับระดับของอุณหภูมิที่ใช้

5.2.2 การจับเรียงตัวของโปรตีน (aggregation)

เมื่อโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติหรือโมเลกุลเกิดการคลายตัวอย่างสมบูรณ์แล้วจะรวมตัวกันหรือเกิดการจับเรียงตัวกันอย่างช้าๆ เพื่อเกิดเป็นโครงร่างตาข่าย ความหนืดของระบบโปรตีนจะเพิ่มอย่างรวดเร็ว และในระยะสุดท้ายระบบของเจลก็จะมีคุณสมบัติบางประการของของแข็งที่มีความหยืดหยุ่น (Hermansson 1978)

การจับเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีนที่เหมาะสมจะทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติ มีความสำคัญต่อการเกิดเจล ซึ่งแตกต่างจากการจับตัวตกตะกอน (coagulation) โดยการเกิดเจลเป็นกระบวนการจัดเรียงตัวของโครงข่ายโมเลกุลอย่างมีระเบียบ ส่วนการจับตัวตกตะกอนเป็นการจับเรียงตัวของโมเลกุลแบบสุ่มและไม่เป็นระเบียบ ปัจจัยที่มีผลต่อระดับการจัดเรียงตัว ได้แก่ อัตราการให้ความร้อน (Mulvihill and Kinsella 1987) ชนิดของโปรตีน ความเข้มข้น และความเป็นกรดด่าง (Stone and Stanley 1992)

อัตราการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในทั้งสองขั้นตอนจะเกิดขึ้นในระดับที่เหมาะสม ถ้าการทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้นเร็วกว่าการจับเรียงตัวของโปรตีนโครงสร้าง 3 มิติที่ได้จะไม่มีความสม่ำเสมอ เจลที่ได้จึงมีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นต่ำแต่ถ้าการทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้นในอัตราที่ไม่สูงมากนัก เจลที่ได้ก็จะมีความยืดหยุ่นและแข็งแรง ขณะที่การจับเรียงตัวในขั้นที่สองเกิดเร็วก็จะมีผลทำให้โปรตีนจับเรียงตัวกันแบบสุ่มซึ่งทำให้โครงสร้างที่ได้สามารถอุ้มน้ำไว้ได้น้อย (Wong 1989 อ้างถึงใน จักรี ทองเรือง 2544)

5.3 พันธะที่เกี่ยวกับการเกิดเจล

เมื่อพิจารณาถึงการเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลโปรตีนในระยะการจับเรียงตัวนั้น จำนวนพันธะที่เกิดขึ้นจะต้องไม่น้อยกว่า 3 พันธะ

พันธะที่สามารถเชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนเข้าด้วยกันซึ่งเป็นพันธะที่มีความสำคัญต่อความคงตัวของโมเลกุลโปรตีน มี 4 ชนิด (Park 1995)

5.3.1 พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds)

เป็นพันธะที่เกิดจากการใช้อะตอมไฮโดรเจนร่วมกันระหว่างอะตอมที่มีขั้วไฟฟ้าลบ 2 อะตอม เช่น ระหว่างอะตอมของไนโตรเจน ออกซิเจน หรือ ซัลเฟอร์ กับอะตอมของออกซิเจนในหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ดังนั้น โมเลกุลของโปรตีนซึ่งมีหมู่ต่างๆ เหล่านี้อยู่ จึงสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ต่างๆ ในโมเลกุลของโปรตีนได้หลายหมู่ เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนอ่อนแอกว่าพันธะอื่นจึงไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดเจลของโปรตีน แต่ก็ยังมีความสำคัญที่ช่วยให้เกิดความคงตัวของน้ำอิสระ (bound water) ที่อยู่ภายในเจลที่มีปริมาณน้ำสูง (hydrogel) เช่น เจลของซูริมิ ซึ่งจำนวนของน้ำที่จับอยู่กับโครงสร้างของสารอื่น หรือ bound water จะมีความสัมพันธ์ค่อนข้างสูงกับความหยืดหยุ่นของเจล และเนื่องจากที่ระดับอุณหภูมิต่ำจะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของโปรตีนขึ้นมากกว่าที่อุณหภูมิสูง เป็นผลให้เจลที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำมีความคงตัวสูงกว่าเจลที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า (Park 1995)

5.3.2 การดึงดูดกันด้วยแรงอิออน หรือปฏิกิริยาต่อกันระหว่างขั้วไฟฟ้า (Electrostatic interaction)

เป็นการดึงดูดกันระหว่างหมู่โซ่ด้านข้างที่มีประจุบวกกับหมู่โซ่ข้างที่มีประจุบนผิวหน้าของโปรตีน เนื่องจากภายในโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยหมู่โซ่ด้านข้างที่สามารถแตกตัวและมีประจุบวกหรือลบ นั่นคือในโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acids) ชนิดต่างๆ โปรตีนที่มีค่าความเป็นกรดด่าง เข้าใกล้ความเป็นกลาง หรือ ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 6.8 นั้น หมู่คาร์บอกซิล (COO^-) ของกรดกลูตามิก (glutamic acid) และแอสพาร์ติก (aspartic acid) ซึ่งในกรดอะมิโนบนสายโซ่โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นลบ ขณะที่หมู่อะมิโน (NH_2^+) ของกรดอะมิโนอีกสองตัวบนสายโซ่โปรตีนคือ ไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine) จะมีประจุสุทธิเป็นบวก ทำให้เกิดสะพานเชื่อมต่อกัน (ionic linkages) เกิดการดึงดูดกันขึ้นได้เมื่อโมเลกุลของโปรตีนเข้าใกล้กันมากพอ ซึ่งเป็นผลให้โมเลกุลของไมโอฟิบริลลาร์โปรตีนแต่ละโมเลกุลเชื่อมติดกันอย่างแนบแน่นเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้น การที่จะทำให้เกิดโครงสร้างของเจลได้ต้องมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพื่อให้อิออนของเกลือ ได้แก่ Na^+ และ Cl^- ไปจับกับอิออนของหมู่ที่มีประจุตรงกันข้ามเพื่อให้ ionic linkages ระหว่างโมเลกุลของไมโอฟิบริลลาร์โปรตีนขาดออกจากกัน ส่งผลให้ไมโอฟิบริลลาร์โปรตีนละลายออกมาและทำให้เกิดโครงสร้างของเจล โดยทำให้เกิดการฟอร์มเจลด้วยความร้อน (heat-set gel) ขึ้นดังสมการ

$$\text{Protein-COO}^-\ldots\ldots{}^+\text{H}_3\text{N-Protein} \xrightarrow{\text{NaCl}} \text{Protein-COO}^-\text{Na}^+ + \text{Cl}^-{}^+\text{H}_3\text{N-Protein}$$

5.3.3 พันธะ หรือปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interactions)

ภายในสายโซ่โปรตีนที่ยังไม่คลายตัวหรือม้วนพับอยู่กรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเหมือนไขมันคือ ไม่รวมตัวกับน้ำ เรียกว่า หมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ส่วนกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณผิวหน้าของสายโซ่โปรตีนที่ยังไม่คลายตัวจะมีคุณสมบัติดูดน้ำและละลายน้ำได้ เรียกว่า หมู่ชอบน้ำ (hydrophilic) เมื่อโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติหรือสายโซ่โปรตีนคลายตัวออก แกนของหมู่ที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ภายในโครงสร้างโมเลกุลจะเปิดเผยตัวออกมาสัมผัสกับน้ำ ทำให้ส่วนของหมู่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนพยายามจะเชื่อมต่อกับโมเลกุลอื่นๆ เรียกว่า hydrophobic binding ความแข็งแรงของพันธะจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (ประมาณ 60 ^{0}ซ) ซึ่งตรงกันข้ามกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนซึ่งจะเกิดที่อุณหภูมิต่ำกว่า

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 04 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 249018
เลขเรียกหนังสือ

5.3.4 พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bounds)

เป็นพันธะโควาเลนต์ที่มีความสำคัญต่อการเกิดเจลและความคงตัวของโปรตีน พันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเป็นพันธะที่มีความแข็งแรงไม่แตกหักง่าย ในระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (สูงกว่า 40°ซ.) พันธะโควาเลนต์ที่มีบทบาทเด่นที่ทำให้เกิดการฟอร์มเจลในโปรตีนคือพันธะไดซัลไฟด์ พันธะไดซัลไฟด์ ที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลของโปรตีน เกิดจากการเกิดออกซิเดชั่นของโมเลกุลของกรดอะมิโนซีสเตอีน (cysteine) สองโมเลกุลที่อยู่บนสายโซ่โปรตีนที่อยู่เคียงข้างกันที่มีหมู่ซัลฟไฮดริล (-SH) ที่มีกิจกรรมอยู่ (Park 1995) ดังสมการ

$$\text{Protein-SH + HS-Protein} \xrightarrow{O_2} \text{Protein-S-S-Protein}$$

ดังนั้นเมื่อเติมสารเร่งการเกิดออกซิเดชั่น เช่น โปรแตสเซียมโบรเมท (potassium bromate) จะทำให้เจลมีความแข็งแรงมากขึ้น (Park 1995)

5.4 การเซ็ทตัว

การเกิดปฏิกิริยาการเซ็ทเจล (setting reaction) เป็นการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำ เกิดเนื่องจากการเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลของกรดอะมิโนกลูตามีน (glutamine) และไลซีน (lysine) ที่อยู่บนสายโซ่โปรตีนที่เคียงข้างกัน และผลของปฏิกิริยาของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase) ที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อปลา เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติละลายในน้ำและถ้าทำการล้างเนื้อปลาบดนานเกินไปเอนไซม์ดังกล่าวจะถูกล้างออกไป การที่เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจะช่วยให้เกิดการเซ็ทเจลของโปรตีนได้จะต้องมีแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) อยู่ด้วย ดังนั้นถ้าจะป้องกันการเกิด เจลของโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำจะต้องเติมสารจับอนุมูลโลหะ (chelating agents) เช่น โซเดียมซิเตรท ซึ่งจะจับกับแคลเซียมอิออนป้องกันไม่ให้เอนไซม์ทรานกลูตามิเนสสร้างสะพานเชื่อมระหว่างโมเลกุลของโปรตีนขึ้น อย่างไรก็ตามเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ได้จากเชื้อราไม่ต้องการแคลเซียมอิออนเป็นตัวช่วยในการเซ็ทเจลของโปรตีนด้วย ซึ่งจะช่วยปรับปรุงคุณภาพของเจลที่มีคุณภาพต่ำให้สูงขึ้น (Park 1995)

เจลที่เตรียมโดยการให้โปรตีนเซ็ทเจลที่อุณหภูมิต่ำ หรือให้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส สร้างสะพานเชื่อมระหว่างโมเลกุลของโปรตีนก่อน แล้วตามด้วยการต้มให้สุกที่อุณหภูมิสูงจะได้เจลที่มีความแข็งแรงกว่าเจลที่ไม่ได้ปล่อยให้เซ็ทเจลที่อุณหภูมิต่ำเสียก่อน

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเซ็ทเจลของโปรตีนจะแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา เนื่องจากโปรตีนไมโอซินในปลาแต่ละชนิดจะมีความคงตัวต่อความร้อนแตกต่างกัน ความคงตัวของโปรตีนต่อความร้อนจะแปรผันไปตามชนิดของปลาเป็นสำคัญ โดยทั่วไปแล้วโปรตีนของปลาที่อาศัยในแหล่งน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่าจะมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่า ขณะที่โปรตีนของปลาที่อาศัยในแหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่าจะมีความคงตัวต่อความร้อนใกล้เคียงกับโปรตีนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือสัตว์ปีก (Park 1995)

สุวรรณ วิรัชกุล และคณะ (2543) ทำการศึกษาสภาวะการให้ความร้อนที่เหมาะสมกับการเกิดเจลของซูริมิจากปลานิลเขตร้อน *(Oreochromis niloticus)* โดยให้ความร้อน 3 สภาวะ ดังนี้ (1) เซ็ทที่ 40 °ซ. 60 นาที (2) เซ็ทที่ 60 °ซ. 60 นาที (3) เซ็ทที่ 90 °ซ. 40 นาที ตามด้วยการต้มที่ 90 °ซ. 40 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณภาพของเจล จากการศึกษาพบว่า การเซ็ทเจลที่อุณหภูมิต่ำคือที่ 40 °ซ. 60 นาที ตามด้วยการต้มที่ 90 °ซ. 40

นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดเจลของซูริมิจากปลานิล ซึ่งให้เจลที่มีคุณภาพสูงกว่าสภาวะอื่นๆ โดยให้เจลที่มีค่าแรงกดและค่าระยะทางก่อนเจลแตกสูงกว่าที่สภาวะอื่นๆ ($p<0.05$) การที่คุณภาพของเจลที่สภาวะการให้ความร้อนที่ 40°ซ. 60 นาที ตามด้วยการต้มที่ 90 °ซ. 40 นาที สูงกว่าอีกสองสภาวะนั้นผู้วิจัยเสนอว่าเป็นผลมาจากช่วงอุณหภูมิ 60-70 °ซ. เป็นช่วงที่เอนไซม์โปรติเนส (proteinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อปลาตามธรรมชาติมีกิจกรรมสูงสุด เอนไซม์นี้จะย่อยสลายโปรตีนซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเจลทำให้คุณภาพของเจลลดลง การเตรียมเจลโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำในครั้งแรกก่อนแล้วตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงอีกครั้งหนึ่งเป็นการสร้างความคงตัวให้แก่เจล การให้ความร้อนครั้งแรกเป็นการให้ความร้อนในระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเกิดเจลของโปรตีนของปลาแต่ละชนิดเพื่อให้การเกิดเจลหรือการสร้างร่างแหโปรตีนอย่างเป็นระเบียบ ก่อนนำไปให้ความร้อนครั้งที่ 2 ที่อุณหภูมิ 90 °ซ. เพื่อทำให้โปรตีนที่เกิดเจลอย่างสมบูรณ์แล้วตกตะกอน เป็นผลให้เจลมีความคงตัวและเจลมีคุณภาพสูงทั้งทางด้านความแข็งและความยืดหยุ่น

Yongsawatdigul and Sinsuwan (2007) ทำการศึกษาผลของการเติมแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ต่อการจับเรียงตัว (aggregation) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformational changes) ของแอกโตไมโอซิน (actomyosin) ที่สกัดได้จากเนื้อปลานิลเขตร้อน *(Oreochromis niloticus)* ในระหว่างการเซ็ทตัวของเจล โดยเติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10-100 มิลลิโมลาร์ ลงไปในแอกโตไมโอซิน และบ่มแอกโตไมโอซินที่อุณหภูมิ 4 และ 40 °ซ. จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้ ความขุ่น (turbidity) ความสามารถในการละลาย ศึกษาการเชื่อมข้ามของโปรตีน (Protein cross-linking studies) พื้นที่ผิวไม่ชอบน้ำ (ANS-surface hydrophobicity) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนแอกโตไมโอซินในระดับ 2^{o} (secondary structure) โดยใช้วิธี Circular dichroism และวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส (breaking force และ deformation) ของเจลโปรตีนแอกโตไมโอซินที่ได้จากเนื้อปลานิล จากการศึกษานี้ผู้วิจัยรายงานว่า แคลเซียมอิออนมีผลต่อการเกิดเจล ของโปรตีนแอกโตไมโอซินที่ได้จากเนื้อปลานิลในระหว่างการเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 40 °ซ. โดยแคลเซียมอิออนจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (TGase) ที่อยู่ภายในโปรตีนแอกโตไมโอซินโดยจะไปเร่งการเชื่อมข้าม (cross-link) พันธะระหว่างกรดอะมิโนกลูตามีนและไลซีน และแคลเซียมอิออนจะไปชักนำให้โมเลกุลของแอกโตมัยโอซินเกิดการคลายตัวออกซึ่งจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวไม่ชอบน้ำ (surface hydrophobicity) โมเลกุลแอกโตไมโอซินที่คลายตัวออกนี้จะเกิดการจับเรียงตัวกันใหม่ระหว่างโมเลกุลภายนอกโดยใช้ปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interactions) ซึ่งแคลเซียมอิออนจะชักนำให้เกิดการคลายตัวของโมเลกุลแอกโตไมโอซินในระหว่างการเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เช่นเดียวกันซึ่งทำให้ปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น และช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของเจล ดังนั้นผู้วิจัยจึงเสนอแนะว่าปลาเขตร้อนซึ่งมีความคงตัวต่อความร้อนสูงต้องการแคลเซียมอิออนเพื่อช่วยให้โปรตีนแอกโตไมโอซินเกิดการคลายตัว และช่วยกระตุ้นการเกิดเจล

ในกล้ามเนื้อของปลานิลเขตร้อน *(Oreochromis niloticus)* มีกิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (TGase) ที่สูง และเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากปลานิลที่ยังไม่บริสุทธิ์ (crude tilapia TGase) นี้เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม (cross-links) ของมัยโอซินเฮฟวี่เชน (myosin heavy chain ;MHC) ซึ่งช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเจลเนื้อปลานิลบด (Worratao and Yongsawatdigul 2003) ในปี 2005 Worratao and Yongsawatdigul ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลานิลโดยใช้ DEAE-Sephacel, Sephacryl S-4 และ HiTrap Heparin โครมาโทกราฟี ซึ่งได้ปริมาณสุทธิ (yield) ร้อยละ12.9 และ purification-fold 69.8 จากนั้นทำการศึกษา

คุณลักษณะของเอนไซม์ดังกล่าวพบว่า มีมวลโมเลกุล 85 กิโลดาลตัน มี isoelectric point (pI) 6.53 อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลานิลคือ 37-50 °ซ. และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม (optimum pH) คือ 7.5 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่เหมาะสมคือ 1.25 มิลลิโมลาร์ และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพิ่มขึ้น

6. การแช่เยือกแข็งปลา

การแช่เยือกแข็งเป็นการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (freezing point) โดยทั่วไปมักจะเป็นที่อุณหภูมิ -18 °ซ. หรือต่ำกว่า ซึ่งตามปกติจุลินทรีย์ที่มีปนอยู่ในอาหารนั้นก็จะหยุดการเจริญเติบโต และหยุดกระบวนการทางเมแทบอลิซึมลงแต่เนื้อเยื่อของอาหารจะยังคงลักษณะอยู่ได้ สำหรับหลักสำคัญคือ การเปลี่ยนสภาวะของน้ำในอาหารที่เป็นของเหลวให้เป็นน้ำแข็ง เพื่อไม่ให้น้ำนั้นสามารถทำหน้าที่ต่างๆ ในปฏิกิริยาเคมีและไม่เป็นสารตั้งต้นให้กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนมากับอาหารได้ (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2543)

กระบวนการแช่เยือกแข็งปลาจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาปลาสดได้นานกว่า 1 ปีโดยการแช่เยือกแข็งและการบรรจุอย่างเหมาะสมก่อนการเก็บรักษาในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิระหว่าง -20 ถึง -30 °ซ. (จักรี ทองเรือง 2544) ซึ่งเมื่อนำปลาเข้าแช่แข็งน้ำในตัวปลาจะเริ่มเปลี่ยนเป็นน้ำแข็งที่อุณหภูมิ -1.5 °ซ. เมื่ออุณหภูมิลดลงถึงที่ -5 °ซ. ร้อยละ 75 ของน้ำในตัวปลาจะเปลี่ยนเป็นน้ำแข็ง และเมื่ออุณหภูมิลดลงถึงที่ -30 °ซ. ร้อยละ 90 ของน้ำในตัวปลาจะเปลี่ยนเป็นน้ำแข็ง สำหรับปัญหาที่พบในการแช่เยือกแข็งแบบช้าๆ (slow freezing) ได้แก่ การเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้น(ice crystal) โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ (protein denaturation) เกิดออกซิเดชั่นของไขมัน (fat oxidation) และเกิดรอยแห้งแข็งเนื่องจากความเย็น (freezer burn) ซึ่งการป้องกันการเกิดปัญหาดังกล่าวทำได้โดยการใช้วิธีการแช่เยือกแข็งอย่างรวดเร็ว (quick frozen) โดยวิธีนี้อุณหภูมิจะลดลงที่ระดับ -5 °ซ. ในเวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง และลดลงถึงที่ -30 °ซ. ในเวลาน้อยกว่า 8 ชั่วโมง (สุวรรณ วิรัชกุล 2544) อย่างไรก็ตามเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาปลาไว้ก่อนใช้ผลิตเพิ่มขึ้นความสามารถในการเกิดเจลของโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ก็จะลดลง (จักรี ทองเรือง 2544; สุวรรณ วิรัชกุล 2544; สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)

7. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อปลาบดระหว่างการเก็บในสภาพแช่เยือกแข็ง

7.1 ผลของเกลือ

ในขณะที่น้ำภายในเซลล์เปลี่ยนเป็นน้ำแข็ง เกลือ และสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำจะถูกทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นในเฟสที่ไม่มีการแข็งตัวส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงค่าความแรงของอิออน (ionic strength) และค่าความเป็นกรดด่าง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ (native form) โดยมีการกระจายตัวผิดปกติ โปรตีนเกิดการจับตัวกัน ส่งผลให้การละลายของโปรตีนลดลง

7.2 ผลของไขมัน

ในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของไขมันดังนี้

7.2.1 การเกิดไฮโดรไลซิสของไขมัน: ทำให้เกิดการสะสมกรดไขมันอิสระส่งผลเร่งการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เนื่องจากข้อสมมติฐานที่ว่า "ไขมันและโปรตีนสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันในระบบจำลองได้" (สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)

7.2.2 การเกิดออกซิเดชั่นของไขมัน: ทำให้เกิดการสลายตัวของเปอร์ออกไซด์ (peroxide) เป็นกรดและสารประกอบคาร์บอนิล ซึ่งทำให้เกิดกลิ่น และรสอันไม่พึงประสงค์

7.3 ผลจากการสูญเสียน้ำของโปรตีน

ในขณะที่เกิดผลึกน้ำแข็งโดยเฉพาะการแช่เยือกแข็งแบบช้า ส่งผลให้มีการสูญเสียน้ำจากภายในเซลล์ เมื่อผ่านการละลายน้ำแข็ง น้ำดังกล่าวไม่สามารถกลับเข้าไปในเซลล์ได้ ก่อให้เกิดน้ำอิสระไหลเยิ้ม (drip) นอกจากนี้ในขณะที่เกิดผลึกน้ำแข็งโมเลกุลน้ำจะเคลื่อนที่จากโปรตีนเพื่อใช้ในการเพิ่มขนาดผลึกน้ำแข็ง ส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนเคลื่อนที่เข้าหากัน และจับเรียงตัวกันเกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)

7.4 ผลของสารประกอบฟอร์มาลดีไฮด์

ในขณะการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เยือกแข็งเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลาย ทำให้เอนไซม์ TMAOase ที่อยู่ในกล้ามเนื้อของปลาทำงานได้ดีขึ้น เพราะ เอนไซม์แพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ โดยเอนไซม์ TMAOase จะเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ TMAO (Trimethylamine oxide) เป็นไดเมททิลเอมีน และ ฟอร์มาลดีไฮด์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ซึ่งสารประกอบฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นนี้เป็นสาเหตุทำให้กล้ามเนื้อของโปรตีนเกิดความเหนียว และสูญเสียสภาพการอุ้มน้ำเนื่องจากการเสียสภาพของโปรตีน (สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)

7.5 ผลของสารอื่นๆ

ออกซิเจนที่ละลายในเลือดและของเหลวภายในปลา สามารถเร่งการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างการเก็บรักษาภายหลังการแช่เยือกแข็ง โลหะหนักมีผลเร่งการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนระหว่างการแช่เยือกแข็ง สำหรับปลาจำพวก Gadoid ทองแดงสามารถเร่งการเปลี่ยนแปลงไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารที่สามารถจับกับโปรตีนแล้วก่อให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)

Biscalchin-Gryschek and others (2003) ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะ และความคงตัวต่อการแช่เยือกแข็งของเนื้อปลาบดล้างน้ำและไม่ล้างน้ำ จากปลานิลสองสายพันธุ์ คือ Nile Tilapia *(Oreochomis niloticus)* และ Red Tilapia (*Oreochromis* spp.) ทำการแช่เยือกแข็งเนื้อปลาบดที่ -40°ซ. และเก็บรักษาที่ -16 °ซ. เป็นเวลา 6 เดือน วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพ ได้แก่ วิเคราะห์ค่า TBARS ความเป็นกรดด่าง และ การไหลเยิ้มของน้ำหลังจากผ่านการแช่แข็ง-ละลาย (freeze-thaw drip) จากการศึกษาพบว่า เนื้อปลาบดแบบไม่ล้างน้ำมีค่า TBARS สูงกว่าเนื้อปลาบดล้างน้ำ และค่า TBARS จะเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง ซึ่งการวิเคราะห์ TBARS เป็นการประเมินการเกิดออกซิเดชั่นของไขมันหรือการเหม็นหืน (rancidity) และค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อปลาบดล้างน้ำสูงกว่าเนื้อปลาบดไม่ล้างน้ำ และการไหลเยิ้มของน้ำหลังจากผ่านการละลายที่เวลา 6 เดือน มีค่าสูงกว่าวันที่ 30 ของการเก็บแช่เยือกแข็งเนื้อปลาบดซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในปลาทั้งสองสายพันธุ์ และเนื้อปลาบดล้างน้ำมีการไหลเยิ้มของน้ำมากกว่าเนื้อปลาบดไม่ล้างน้ำ ผู้วิจัยเสนอแนะว่าการควักไส้ลอกหนัง และการล้างน้ำจะช่วยล้างเอากรดไขมันไม่อิ่มตัวออกไปส่งผลช่วยลดการเกิดออกซิเดชั่นของไขมันได้

การล้างน้ำจะช่วยเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อปลาบด และการไหลเยิ้มของน้ำในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง ชี้ให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน และการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ดังนั้นผู้วิจัยสรุปว่าเนื้อปลาบดจากปลานิลทั้งสองสายพันธุ์สามารถเก็บภายใต้อุณหภูมิ -16 °ซ. เป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งเนื้อปลาบดยังมีความคงตัว และเหมาะสมต่อการบริโภค

Benjakul and others (2005) ทำการศึกษาผลของการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งต่อคุณสมบัติทางเคมีและการเกิดเจลซูริมิของปลาที่อาศัยอยู่ในเขตอ่าวไทย ได้แก่ ปลาทรายแดง ปลาตาหวาน ปลาปากคม และปลาจวด เพื่อนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ซูริมิต่อไป โดยนำปลาทั้งตัวมาเก็บรักษาที่ -18 °ซ. นาน 6 เดือน เมื่อต้องการวิเคราะห์นำปลามาละลายน้ำแข็ง เลาะเอากระดูกออก นำไปบดล้างน้ำ และทำซูริมิ ทำการวิเคราะห์กิจกรรม Ca^{2+}- ATPase ของแอกโตไมโอซินที่สกัดจากกล้ามเนื้อปลาและวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) ของซูริมิ ความสามารถในการละลายของโปรตีน การวิเคราะห์ค่า TBARS และทำการเซ็ทเจลจากซูริมิเนื้อปลาต่างๆ แล้วนำไปศึกษาคุณสมบัติของเจล (gel strength และ deformation) จากการศึกษาพบว่า กิจกรรมของ Ca^{2+}-ATPase ของแอกโตไมโอซินตามธรรมชาติจากปลาทุกชนิดลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งอัตราการลดลงของกิจกรรม Ca^{2+}-ATPase ขึ้นกับชนิดของปลา ซึ่งพบว่าหลังจากการเก็บรักษา 6 เดือน ปลาปากคมจะมีอัตราการลดลงของกิจกรรม Ca^{2+}-ATPase มากที่สุด ซึ่งกิจกรรม Ca^{2+}-ATPase สามารถบ่งชี้ถึงความสมบูรณ์ของไมโอซิน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไมโอซินเกิดการเสียสภาพในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งซึ่งไมโอซินจากกล้ามเนื้อปลาปากคมเกิดการเสียสภาพมากสุด และพบว่าปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในปลาปากคมเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเวลาในการแช่เยือกแข็งเพิ่มขึ้น แต่พบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์น้อยในปลาชนิดอื่นๆ และพบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง ซึ่งปลาปากคมมีความสามารถในการละลายน้อยที่สุดเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งครบ 6 เดือน นอกจากปลาปากคมแล้วการสูญเสียความสามารถในการละลายยังพบในปลาชนิดอื่นแต่พบในปริมาณน้อย และพบว่า TBARS ในกล้ามเนื้อของปลาทุกชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการเก็บรักษาปลา ซึ่งอัตราการเพิ่มขึ้นนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา โดยค่า TBARS บ่งบอกถึงการเกิดออกซิเดชั่นของไขมันในระหว่างการแช่เยือกแข็งซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพของเจลซูริมิที่ได้จากปลาแช่เยือกแข็ง พบว่าค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength) และค่าระยะทางที่ทำให้เจลแตก (deformation) ของเจลซูริมิจากปลาทั้ง 4 ชนิดลดลงเมื่อเพิ่มเวลาในการแช่เยือกแข็งปลา โดยเฉพาะเจลของซูริมิจากปลาปากคมซึ่งสัมพันธ์กับการเสียสภาพของโปรตีน

8. สารป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนในระหว่างแช่เยือกแข็ง

8.1 ความหมาย

สารป้องกันการสูญเสียคุณภาพของอาหารแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิต่ำ (Cryoprotectants) หมายถึงสารประกอบใดๆ ที่สามารถป้องกันการเสียคุณภาพของอาหารแช่เยือกแข็งระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ นั่นคือสารชนิดนี้จะมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็ง ทั้งนี้สารดังกล่าวอาจพบอยู่ในอาหารตามสภาพธรรมชาติหรือผสมลงในอาหารในระหว่างการผลิต (จักรี ทองเรือง 2544)

โดยทั่วไปแล้วโปรตีนแอกโตไมโอซินจะสูญเสียโครงร่างโมเลกุลตามสภาพธรรมชาติในระหว่างการเก็บรักษาปลาหรือเนื้อปลาบดในสภาวะแช่เยือกแข็ง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากความสามารถในการสกัด

(extractability) และกิจกรรมของเอนไซม์ Ca^{2+}-ATPase ที่ลดลงซึ่งสัมพันธ์กับความแข็งแรงของเจลที่ลดลง อัตราการสูญเสียโครงร่างโมเลกุลตามสภาพธรรมชาติของโปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดปลา โดยปลาในเขตร้อนจะมีแนวโน้มสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่ายกว่าปลาในเขตหนาว (สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549) ดังนั้นในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อปลานิลบดแช่เยือกแข็ง จึงมีความจำเป็นต้องเติมสารป้องกันการสูญเสียคุณภาพของอาหารแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิต่ำ ในกรณีนี้สารดังกล่าวก็คือ สารป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน สารที่มีความสามารถเป็นสารป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนมีคุณลักษณะที่สำคัญดังนี้ 1)ในโมเลกุลประกอบด้วยหมู่ต่อไปนี้คือ -OH, -COOH, หรือ $-OPO_3H_2$ อย่างน้อย 1 หมู่ และประกอบด้วยหมู่เสริมอื่นๆ มากกว่า 1 หมู่ ได้แก่ หมู่ -OH, -COOH, $-NH_2$, -SH, $-SO_3H$ และ/หรือ $-OPO_3H$ 2) หมู่ดังกล่าวจะต้องจัดตัวในที่ว่าง (configuration) ในทิศทางและตำแหน่งที่เหมาะสมต่อกันและกัน การมีคุณลักษณะใน 2 ข้อแรกนี้โดยเฉพาะการมีหมู่ต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วซึ่งเมื่ออยู่ในสารละลายจะสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้หลายพันธะยังคงเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของสารเหล่านี้ นอกจากนี้อีกคุณลักษณะหนึ่งของสารนี้ก็คือ ขนาดโมเลกุลค่อนข้างมีขนาดเล็ก ซึ่งภายหลังพบว่ามีสารบางชนิดที่มีโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่แต่มีคุณสมบัติป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ เช่น โพลีเด็กซ์โตรส (polydextrose) (สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549) ซึ่งสารที่อยู่ในข่ายที่จะมีคุณสมบัติป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต น้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำบางชนิด โพลีออล (polyols) กรดอะมิโน(amino acids) กรดคาร์บอกซิลิก(carboxylic acids) และโพลีฟอสเฟต(polyphosphates) (Zhou and others 2006) โดยปกติแล้วจะใช้ร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด นิยมใช้ซูโครสร้อยละ 4 ร่วมกับซอร์บิทอลร้อยละ 4 และพอลิฟอสเฟตร้อยละ 0.2-0.3 (Sultanbawa and Li-Chan 1998)

8.2 สารประกอบฟอสเฟต

8.2.1 คุณสมบัติ และหน้าที่ในอาหารของสารประกอบฟอสเฟต

(1) สมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ ออร์โธฟอสเฟตมีสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ที่ดีที่สุดสำหรับช่วงความเป็นกรดด่าง 2-3, 5.5-7.5 และ 10-12 ส่วนสารประกอบพอลีฟอสเฟตชนิดโซ่ยาวมีสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ และสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์จะลดลงเมื่อความยาวโซ่เพิ่มขึ้น ดังนั้น สารประกอบฟอสเฟตจึงช่วยรักษาความเป็นกลางซึ่งเป็นสภาพที่โปรตีนมีความคงตัวมากที่สุด

(2) สมบัติในการจับกับอิออนของโลหะที่มีประจุ +2 ชนิดต่างๆ เช่น Ca^{2+} Mg^{2+} Cu^{+2} และ Fe^{+2} ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของการสร้างสะพานเชื่อมไดซัลไฟด์ที่มีผลเพิ่มการจับตัวกันของโมเลกุลโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้อิออนของโลหะดังกล่าวมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสี และกลิ่นรสของอาหาร การใช้ฟอสเฟตจับกับอิออนโลหะจึงสามารถลดปัญหาดังกล่าว สารพอลิฟอสเฟตชนิดสายโซ่ให้ผลจับโลหะที่ดี แต่ประสิทธิภาพการจับโลหะจะลดลงเมื่อความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้น

(3) สมบัติเป็นสารพอลิอิเล็กโตรไลต์ สารประกอบฟอสเฟตแตกตัวเป็นประจุลบมากกว่า 1 ประจุ เช่น ออร์โธฟอสเฟตให้ประจุตั้งแต่ 1-3 อะตอม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเป็นกรดด่าง สำหรับสารพอลิฟอสเฟตจะมีประจุลบเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นสารประกอบฟอสเฟตจึงสามารถจับกับองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหารก่อให้เกิดความคงตัวหรือการกระจายตัวขององค์ประกอบได้

(4) สารประกอบฟอสเฟตยังช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารและยังช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำของอาหารอีกด้วย (จักรี ทองเรือง 2544; สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)

8.2.2 การใช้สารประกอบฟอสเฟตในอาหาร

สารประกอบฟอสเฟตที่ใช้เป็นสารป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนในระหว่างการแช่เยือกแข็งได้แก่ ไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate) ไตรโพลีฟอสเฟต (tripolyphosphate) และ เฮกซะเมตาฟอสเฟต (hexametaphosphate) ในปริมาณร้อยละ 0.15-0.3 (จักรี ทองเรือง 2544) ซึ่งในอุตสาหกรรมปลาบดแช่เยือกแข็งส่วนใหญ่จะใช้ โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตร้อยละ 0.3 ร่วมกับ ซูโครสร้อยละ 4 และ ซอร์บิทอลร้อยละ 4 โดยน้ำตาลจะช่วยรักษาสีของเนื้อปลาบดไม่ให้เปลี่ยนแปลง และยังช่วยรักษาความสามารถในการอุ้มน้ำอีกด้วย (Molins 1991)

ไพโรฟอสเฟต และไตรโพลีฟอสเฟตสามารถเพิ่มการละลายของโปรตีน และสามารถแทรกซึมผ่านชิ้นเนื้อได้ดีกว่าเฮกซะเมตาฟอสเฟต ทั้งนี้เนื่องจากเฮกซะเมตาฟอสเฟตมีโมเลกุลขนาดใหญ่จึงเกิดการซึมผ่านได้น้อย และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอัตราการแพร่ และการดูดซับลดลงอาจจะเป็นผลจาก salting-out จากความแรงอิออนที่สูงขึ้น ฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (ร้อยละ 1.6) สามารถช่วยให้น้ำซึมผ่านชิ้นเนื้อได้ในระดับลึกขณะที่ฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 3.2) ร่วมกับสารละลายเกลือสามารถเพิ่มการซึมผ่านน้ำที่ชั้นผิวหนังของชิ้นเนื้อ (Xiong and Kupski 1999) ไพโรฟอสเฟตสามารถซึมผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อได้มากที่สุด สังเกตได้จากการละลายของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น ทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อเกิดการพองตัว (Offer and Trinick 1983) และไพโรฟอสเฟตยังทำให้เกิดการแตกตัวของแอกโตไมโอซินเป็นไมโอซิน และแอกติน ซึ่งเกิดการแตกตัวของแอกโตไมโอซินทำให้เกิดช่องว่างในไมโอไฟบริลทำให้เพิ่มการดูดซับน้ำ (Bendall 1945) นอกจากนี้การใช้ฟอสเฟตร่วมกับสารละลายเกลือสามารถเพิ่มสมบัติการเชื่อมประสานของลูกชิ้นเนื้อ (Moore and others 1976) โดยสามารถเร่งการแตกตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อและเพิ่มการละลายโปรตีนไมโอไฟบริล (Theno and others 1978)

8.2.3 ผลเสียของสารประกอบฟอสเฟต

สารประกอบฟอสเฟตมีการจำกัดปริมาณการใส่ ในอาหารทะเลแช่เยือกแข็งไม่เกิน 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (คำนวณเป็นฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์) และในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่นไส้กรอก แฮม ไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 2547) หากใส่มากเกินไปจะส่งผลที่ไม่ดีต่อเนื้อสัมผัสของอาหาร เกิดการกัดกร่อนของโลหะ เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรส เช่นเกิดกลิ่นรสคล้ายสบู่หรือมีรสฝาด และหากบริโภคอาหารที่มีฟอสฟอรัสสูงและแคลเซียมต่ำเป็นเวลานาน จะส่งผลเสียต่อร่างกายโดยทำให้ระดับฟอสฟอรัสในเลือดสูงและแคลเซียมในเลือดต่ำ ร่างกายจะเพิ่มการสลายแคลเซียมออกจากกระดูก มีความเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกพรุน (osteoporosis) (ลักษณา อินทร์กลับ 2543) การใช้สารประกอบฟอสเฟตเป็นการเพิ่มปริมาณโซเดียมในอาหาร ซึ่งเป็นผลเสียต่อผู้บริโภคที่มีปัญหา เรื่องโรคความดันเลือดสูง ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ และผู้ป่วยโรคไตต้องหลีกเหลี่ยงอาหารที่มีฟอสเฟตสูง (Tonelli and others 2005) นอกจากนี้ในบางประเทศ เช่น นิวซีแลนด์และบางประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปมีการห้ามใช้สารประกอบฟอสเฟตในอาหารบางชนิด และญี่ปุ่นมีความตื่นตัวมากในการเลือกบริโภคอาหารที่ไม่มีสารประกอบฟอสเฟต ดังนั้นจึงเริ่มมีการวิจัยหาสารเติมแต่งอาหารอื่นที่ใช้ทดแทนสารประกอบฟอสเฟตได้

8.3 ไฮโดรคอลลอยด์ (Hydrocolloid)

ไฮโดรคอลลอยด์ หมายถึง สารประกอบประเภทพอลิแซคคาไรด์กัม (polysaccharide gums) เป็นพอลิเมอร์ที่มีสายยาวและน้ำหนักโมเลกุลสูงในโมเลกุลอาจประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ชนิดเดียวกันทั้งหมด ซึ่ง

เรียกว่าโฮโมโพลิแซคคาไรด์ เช่น เดกซ์แทรน (dextran) และฟอสโฟแมนแนน (phosphomannan) หรือประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์หลายชนิด ซึ่งเรียกว่าเฮเตอโรพอลิแซคคาไรด์ เช่น กัมอะราบิก (gum arabic) กัมแกตติ (gum ghatti) และกัมคารายา (gum karaya) เป็นต้น เมื่อไฮโดรคอลลอยด์ละลายน้ำหรือกระจายตัวอยู่ในน้ำจะทำให้สารละลายที่ได้มีความหนืดสูงหรือมีลักษณะเป็นเจล ในอุตสาหกรรมอาหารจึงได้นำไปใช้ประโยชน์เป็นสารเติมแต่งอาหาร เช่น เป็นสารเพิ่มความคงตัว (stabilizer) สารเพิ่มความหนืด (thickener) อิมัลซิไฟเออร์ สารช่วยให้กระจายตัว (suspending agent) สารช่วยให้เกิดเจล (gelling agent) สารช่วยฟอร์มฟิล์ม (film-foaming agent) และสารเคลือบหุ้ม (encapsulating) เป็นต้น ซึ่งหน้าที่ดังกล่าวจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพที่ดีขึ้น เช่น มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดี และมีอายุการเก็บรักษานานขึ้น (นิธิยา รัตนาปนนท์ 2545)

การจำแนกชนิดของไฮโดรคอลลอยด์ สามารถจำแนกได้ 2 วิธี (นิธิยา รัตนาปนนท์ 2545) ดังนี้

8.3.1 จำแนกตามแหล่งที่มา ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

(1) ไฮโดรคอลลอยด์ซึ่งได้มาจากธรรมชาติส่วนใหญ่ได้มาจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ยาง เมล็ด ราก หัว และได้จากสาหร่ายทะเล (sea weed) บางชนิดได้มาจากสัตว์ เช่น เจลาติน

(2) ไฮโดรคอลลอยด์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารที่ได้มาจากธรรมชาติ หรือดัดแปลงสารจากธรรมชาติ (modified natural) เช่นอนุพันธ์ของเซลลูโลส และอนุพันธ์ของสตาร์ช

(3) ไฮโดรคอลลอยด์ซึ่งเป็นสารที่สังเคราะห์ (synthetic) ขึ้น เช่น พอลิไวนิลไพโรลิดีน (polyvinylpyrrolidene) และพอลิเอทิลีนออกไซด์พอลิเมอร์ (polyethylene oxide polymers)

ซึ่งไฮโดรคอลลอยด์กลุ่มที่นิยมใช้มากในผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่ได้มาจากธรรมชาติ

8.3.2 จำแนกตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล และ functional หรือ reactive group ที่อยู่ในโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งอาจเป็นประจุลบ (anionic) คือพวกที่มีหมู่ซัลเฟต หมู่คาร์บอกซิลิก และหมู่ฟอสเฟต เช่น คาราจีแนน คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส และแซนแทนกัม เป็นต้น ไม่มีประจุ (nonionic) เช่น โลคัสบีนกัม และ กัวร์กัม เป็นต้น (ตารางที่1) หรือ เป็นกลาง (neutral)

8.4 แซนแทนกัม (xanthan gum) (นิธิยา รัตนาปนนท์ 2545)

แซนแทนกัม หรือ polysaccharide B-1459 เป็นไฮโดรคอลลอยด์จากธรรมชาติที่ได้โดยการหมักด้วยแบคทีเรีย คือ *Xanthomonas campestris* หลังจากเกิดกระบวนการหมักแล้ว จะนำสารละลายที่ได้มาตกตะกอนแยกเอาแซนแทนกัมออก ด้วยไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ ทำให้แห้งแล้วบดให้เป็นผงละเอียด ซึ่งในโครงสร้างของโมเลกุลแซนแทนกัมมีหมู่คาร์บอกซิลิกอยู่จึงจัดว่าเป็นไฮโดรคอลลอยด์ในกลุ่มที่มีประจุลบ (anionic) แซนแทนกัม หรือเรียกชื่อทางการค้าว่า Keltrol เป็นเฮเตอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่มีน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และกรดกลูคูโรนิก ในอัตราส่วน 2.8 : 2.0 : 2.0 มีหมู่อะซิติลประมาณ 4.7 เปอร์เซ็นต์ และกรดไพรูวิกประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำตาลกลูโคสต่อกับแมนโนสด้วยพันธะ β-(1$\rightarrow$4) และน้ำตาลแมนโนสที่เป็นสายแขนงต่อกับสายหลักด้วยพันธะ 1$\rightarrow$2 หรือ 1 $\rightarrow$ 3 ส่วนกรดกลูคูโรนิกต่อกันด้วยพันธะ β-(1$\rightarrow$2) (ภาพที่ 4) เป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,000 ถึง 20,000 กิโลดาลตัน (Garcia-Ochoa and others 2000) แซนแทนกัมไม่มีสมบัติเป็น gelling agent แต่สามารถเกิดเจลที่ผันกลับได้ด้วยความร้อน

(thermo-reversible gel) ที่มีความยืดหยุ่นได้เมื่อใช้ร่วมกับโลคัสต์บีนกัม และเมื่อร่วมกับกัวร์กัมจะให้สารละลายที่มีความหนืดสูง

ตารางที่ 1 การจำแนกชนิดของไฮโดรคอลลอยด์ตามลักษณะโครงสร้างของโมเลกุล

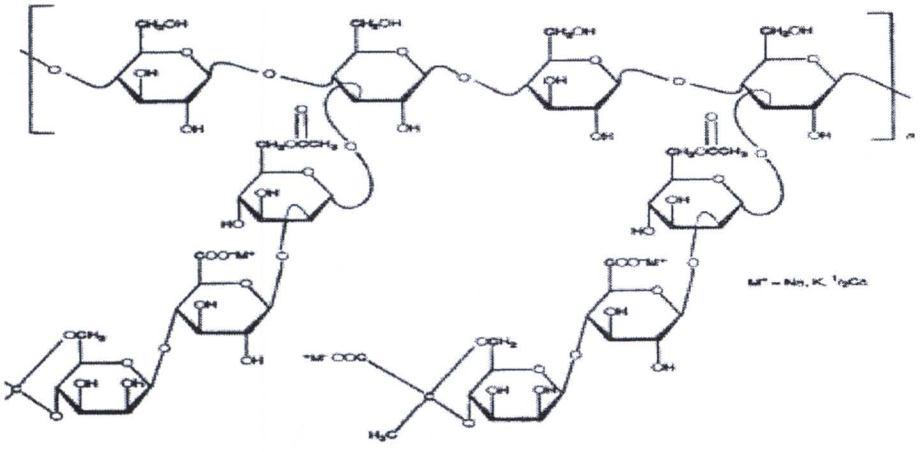
ไฮโดรคอลลอยด์จากธรรมชาติ	ไฮโดรคอลลอยด์กึ่งสังเคราะห์
ซัลเฟต (Sulfated) คาร์ราจีแนน เฟอเซลลาแรน อะการ์ Iridophycan Fucoidan Hypnean	สตาร์ชซัลเฟต
คาร์บอกซิลิก (Carboxylic) แอลจิเนต เพกติน กัมอะราบิก กัมทรากาแคนต์ กัมคารายา กัมแกตติ แซนแทนกัม ลาร์ชกัม Quince seed gum, Psyllium seed gum, Okra gum	 คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เพกติน (เมทอกซิลต่ำ) โพรพิลีนไกลคอลแอลจิเนต ไตรเอทานอลามีนแอลจิเนต คาร์บอกซีเมทิล โลคัสต์บีนกัม คาร์บอกซีเมทิล กัวร์กัม
ฟอสโฟรีเลต (Phosphorylated) ฟอสโฟแมนแนน (phosphomannans)	 สตาร์ชฟอสเฟต
ไม่มีประจุ (Nonionic) เดกซ์แทรน สตาร์ช โลคัสต์บีนกัม กัวร์กัม แทมมารินด์กัม ลามินาแรน (Laminaran)	 เมทิลเซลลูโลส ไฮดรอกซีโพรพิลเซลลูโลส เอทิลไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส

ที่มา : Graham (1978)

แซนแทนกัมนิยมใช้มากในอาหาร เพราะมีสมบัติพิเศษที่สำคัญ คือ กระจายตัวและละลายได้ดีทั้งน้ำเย็นและน้ำร้อน สารละลายที่ได้มีความหนืดสูง แม้จะมีความเข้มข้นต่ำและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ มีความคงตัวสูงต่อความร้อนและความเป็นกรดด่างโดยเฉพาะความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมจะคงที่ ถึงแม้อุณหภูมิจะเปลี่ยนแปลงในช่วง 0-100 °ซ หรือความเป็นกรดด่างจะเปลี่ยนแปลงในช่วง 1-13 °ซ ก็ตามนอกนั้นสารละลายแซนแทนกัมยังมีสมบัติเป็นซูโดพลาสติก ซึ่งมีความสำคัญต่อกลิ่น ลักษณะปรากฏ และความรู้สึกเมื่ออาหารอยู่ในปาก (mount feel)

แซนแทนกัมใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดทั้งที่เป็น suspension และอิมัลชันทำหน้าที่เป็นสารเพิ่มความหนืด สารเพิ่มความคงตัว และทำให้อนุภาคแขวนลอยได้ดี เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวให้กับ

ไอศกรีม เพราะเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจะมีผลต่อความหนืดน้อยมาก เช่น ความหนืดจะไม่เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำลง ในภาวะที่เป็นกรดแซนแทนกัมสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน ทำให้เกิดการตกตะกอนทั้งชนิดตะกอนนอนก้น (precipitation) และ/หรือตะกอนแขวนลอย (flocculation) อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาระหว่างแซนแทนกัมกับโปรตีนในภาวะที่เป็นกรดสามารถควบคุมได้ โดยการเติมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส



ภาพที่ 4 โครงสร้างแซนแทนกัม

ที่มา : Garcia-Ochoa and others (2000)

8.5 การใช้สารประกอบไฮโดรคอลลอยด์ในเนื้อปลาบด

ในปี 1981 Codex Alimentarius Commision (อ้างถึงในนิธิยา รัตนาปนนท์ 2545) จัดให้สารประกอบไฮโดรคอลลอยด์ เช่น โซเดียมอัลจิเนต (Sodium algenate) เพกติน(Pectin) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose, CMC) โลคัสบีนกัม (Locus bean gum) กัวกัม (Guar gum) คาราจีแนน (Carageenan) และแซนแทนกัม (Xanthan gum) เป็นสารเติมแต่งอาหารที่แนะนำให้ใช้ได้ในเนื้อปลาบด

การศึกษาการใช้สารประกอบไฮโดรคอลลอยด์นี้ป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติในเนื้อปลาบดในระหว่างแช่เยือกแข็งเริ่มตั้งแต่ ปี 1984 Da Ponte and others ได้ทำการศึกษาผลของการใส่สารประกอบไฮโดรคอลลอยด์ ได้แก่ แซนแทนกัม โลคัสบีนกัม อิออต้าคาราจีแนน และแซนแทนกัมร่วมกับโลคัสบีนกัม ที่ความเข้มข้น 5 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งเตรียมสารประกอบไฮโดรคอลลอยด์ดังกล่าวโดยการละลายในน้ำก่อนแล้วนำไปทำแห้งขณะแช่เยือกแข็ง (freeze drying) เพื่อเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำกับไฮโดรคอลลอยด์ หลังจากนั้นนำไฮโดรคอลลอยด์ที่เตรียมได้ไปบดผสมกับเนื้อปลา whiting บด โดยไม่มีการเติมสารประกอบฟอสเฟต ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำ การสูญเสียน้ำหนักหลังผ่านการให้ความร้อน ลักษณะเนื้อสัมผัส ปริมาณไมโอซินที่สกัดได้ (extractable myosin) การวิเคราะห์ปริมาณไดเมทิลเอมีน และฟอร์มาลดีไฮด์ และการวัดสี ของเนื้อปลาบดในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งที่ -18 °ซ. นาน 3 เดือน พบว่าการเติมสารไฮโดรคอลลอยด์ดังกล่าวจะช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อปลาบดได้ โดยเฉพาะแซนแทนกัมสามารถปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัส และความขาวของเนื้อปลาบดสุกในระหว่างการแช่เยือกแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม แซนแทนกัม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ไอออต้าคาราจีแนน และแซนแทนกัมร่วมกับโลคัสบีนกัมทำให้ปริมาณไดเมทิลเอมีน และฟอร์มาลดีไฮด์ของเนื้อปลาบดลดลงในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง อย่างไรก็ตามการเติมสารในกลุ่มไฮโดรคอลลอยด์นี้ไม่สามารถป้องกันการสูญเสียสภาพของโปรตีนไมโอซินในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งได้

ต่อมาในปี 1985 Da Ponte and others ได้ทำการศึกษาผลของการใส่สารประกอบไฮโดรคอลลอยด์ได้แก่ เพกติก 2 ชนิด (Low methoxy-esterified pectin or High methoxy-esterified pectin) แคปป้าคาราจีแนน (K-carageenan) และอัลจิเนต 3 ชนิด (Kelcogel HV or Kelcosol or Kelcocol) ซึ่งมีวิธีการทดลองที่เหมือนกันกับงานวิจัยก่อนหน้านี้แต่ใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษาเนื้อปลา whiting บด สั้นกว่า เป็นเวลานาน 2 เดือน พบว่าตัวอย่างเนื้อปลาบดดิบที่ใส่อัลจิเนต (Kelcogel HV และ Kelcosol) มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำสูงที่สุด และมีค่าความเหนียว (toughness) ต่ำสุด ในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง 2 เดือน อย่างไรก็ตามนอกจากตัวอย่างที่เติม Kelcosol การเติมไฮโดรคอลลอยด์ตัวอื่นในงานวิจัยนี้ไม่สามารถป้องกันการสูญเสียสภาพของโปรตีนไมโอซินในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งได้ นอกจากนี้พบว่าในทุกตัวอย่างที่เติมไฮโดรคอลลอยด์มีปริมาณไดเมทิลเอมีนและฟอร์มาลดีไฮด์ของเนื้อปลาบดเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง 2 เดือน

ในปี 1987 Da Ponte and others ได้ทำการศึกษาผลของการใส่สารสารประกอบไฮโดรคอลลอยด์ได้แก่ ไอออตา-คาราจีแนน (iota-carrageenan) คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส หรือแซนแทนกัม ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัม ในผลิตภัณฑ์เนื้อปลาคอดบดผสมประเภททอด ได้แก่ fish chips และ fish sticks โดยเก็บตัวอย่างไว้ที่ -18 °ซ นาน 8 เดือน และทำการวัดการสูญเสียน้ำหนักหลังจากการทอด (weight loss) ความสามารถในการดูดซับไขมัน (fat uptake) ลักษณะทางเนื้อสัมผัสโดยใช้เครื่องมือ และทดสอบความชอบทางประสาทสัมผัส (sensory properties) พบว่า สารประกอบไฮโดรคอลลอยด์ทุกตัวมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนในระหว่างการแช่เยือกแข็ง โดยจะช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำหนักหลังจากการทอด และรักษาเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ซึ่งความชอบทางประสาทสัมผัสจะสัมพันธ์กับการใช้เครื่องมือในการวัดเนื้อสัมผัสและการสูญเสียน้ำหนักหลังจากการทอด หลังจากระยะเวลาการเก็บแช่เยือกแข็ง 8 เดือนพบว่า fish chips ที่เติม คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส หรือแซนแทนกัม มีความชอบทางประสาทสัมผัสที่ดีกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมไฮโดรคอลลอยด์ และหลังจากระยะเวลาการเก็บแช่เยือกแข็ง 14 สัปดาห์ พบว่า fish sticks ที่เติม ไอออตา-คาราจีแนน มีความชอบทางประสาทสัมผัสที่น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า ไอออตา-คาราจีแนนและคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส ช่วยลดการดูดซับน้ำมัน (fat uptake) ในระหว่างการทอดอีกด้วย

อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารประกอบไฮโดรคอลลอยด์มาใช้เป็นสารป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติในเนื้อปลาบดในระหว่างแช่เยือกแข็งยังมีน้อย ส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาผลของการเติมเพื่อใช้ปรับปรุงคุณภาพของเจลจากเนื้อปลาบดมากกว่าจะใช้เป็นสารรักษาคุณภาพของเนื้อปลาบดในระหว่างการเก็บรักษา งานวิจัยของ Perez and others (2001) ได้ทำการศึกษาผลของการเติมสารแคปป้าคาราจีแนนร่วมกับไฮโดรคอลลอยด์อื่นๆ ได้แก่ โลคัสบีนกัม กัวกัม แซนแทนกัม ไอออต้าคาราจิแนน โซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส หรือโซเดียมอัลจิเนต โดยเติมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ยกเว้น การเติมแคปป้าคาราจีแนนร่วมกับโลคัสบีนกัมเติมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 เพื่อปรับปรุงคุณภาพของเจลจากเนื้อปลา Blue whiting บด โดยทำการวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส และความสามารถในการอุ้มน้ำของเจล พบว่า การเติมแคปป้าคาราจีแนน

ร่วมกับโลคัสบีนกัมจะทำงานเสริมกันดีกว่าการเติมแคปป้าคาราจีแนนกับไฮโดรคอลลอยด์ตัวอื่นโดยช่วยปรับปรุงความแข็ง (hardness) การเกาะตัวกัน (cohesiveness) และความสามารถในการอุ้มน้ำของเจล

8.6 โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate)

โซเดียมไบคาร์บอเนต หรือ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต บางที่เรียกเบคกิ้งโซดามีสูตรเคมีคือ $NaHCO_3$ มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว หรือแป้งสีขาว ซึ่งมีสมบัติช่วยเพิ่มความเป็นกรดด่าง ทำให้อาหารขึ้นฟู ช่วยปรับปรุงสี และรสชาติ และปรับปรุงความแข็งแรงของเจล (Bledsoe and others 2000) โซเดียมไบคาร์บอเนตสามารถละลายได้ในน้ำ แต่ไม่ละลายในเอธทานอล เมื่อนำไปละลายในน้ำเย็นในอัตราส่วน 1:100 โดยปราศจากการเขย่าสามารถวัดค่าความเป็นกรดด่างของสารได้ 8.0-8.6 (FAO 2005)

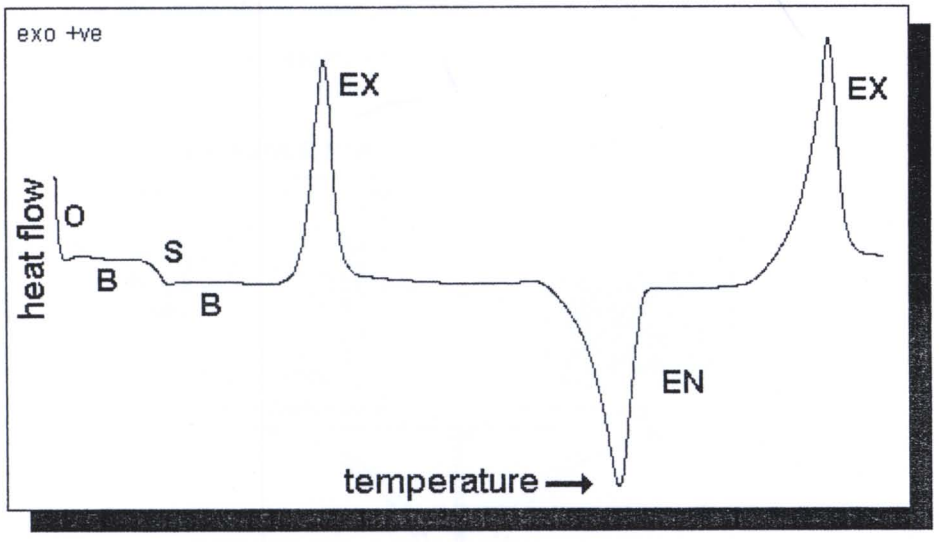
เนื่องจากอันตรายของสารประกอบฟอสเฟตดังที่ได้กล่าวมาแล้วก่อนหน้านี้จึงมีการศึกษาการใช้สารโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเพื่อใช้ทดแทนสารประกอบฟอสเฟตในฐานะที่เป็นสารป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติในเนื้อปลาบดในระหว่างการแช่เยือกแข็ง

Kanayama and others (1994) ก็ได้จดสิทธิบัตรการผลิตซูริมิแช่เยือกแข็งโดยการใช้เกลือคาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนตในซูริมิร่วมกับการปรับให้ซูริมิมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 7.5 ทดแทนสารประกอบฟอสเฟต โดยเกลือคาร์บอเนตที่รายงานว่าสามารถใช้ได้ ได้แก่ โซเดียมคาร์บอเนต โพแทสเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมคาร์บอเนต หรือแมกนีเซียมคาร์บอเนต ในปริมาณร้อยละ 0.02 หรือระหว่างร้อยละ 0.04-0.06 ซึ่งการใช้โซเดียมคาร์บอเนตมีความเหมาะสมที่สุด สำหรับเกลือไบคาร์บอเนตที่สามารถใช้ได้ ได้แก่ โซเดียมหรือโพแทสเซียมไบคาร์บอเนตในปริมาณร้อยละ 0.03 หรือในระหว่างร้อยละ 0.05-0.15 ซึ่งโซเดียมไบคาร์บอเนตมีความเหมาะสมที่สุด

Kolakowski and others (1994) ศึกษาผลของการเติมสารโซเดียมไบคาร์บอเนตลงในเนื้อปลา Baltic cod *(Gadus morhua callarias)* บด โดยวิเคราะห์การหดตัวและการสูญเสียน้ำหนักหลังจากผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน และลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อปลาบดในระหว่างเก็บแช่เยือกแข็งที่ -20 °ซ. นาน 2.5 เดือน พบว่า การเติมสารโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 2.5-10 กรัม/กิโลกรัม ช่วยลดการหดตัวของเนื้อปลาบดเมื่อผ่านการแปรรูปด้วยความร้อน และช่วยลดการสูญเสียน้ำหนักหลังผ่านการให้ความร้อนได้มากกว่าร้อยละ 25 นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสารโซเดียมไบคาร์บอเนตช่วยปรับปรุงลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสโดยช่วยลดความแข็ง (hardness) ของเนื้อปลาบด และที่ความเข้มข้น 2.5 กรัม/กิโลกรัม ช่วยลดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งอีกด้วย

Bledsoe and others (2000) ศึกษาผลของการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตและโพแทสเซียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$ และ $KHCO_3$) ร่วมกับสารประกอบฟอสเฟตหรือใช้ทดแทนเพียงบางส่วนในซูริมิที่ได้จากปลาสองสายพันธุ์คือ Alaska pollock *(Theragra chalcogramma)* และ Pacific whiting *(Merluccius productus)* จากนั้นนำไปเซ็ทเจลแล้ววิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสของเจล พบว่าการเติมไบคาร์บอเนตลงไปในซูริมิส่งผลทั้งที่ดีและไม่ดีต่อคุณภาพของเจล ทั้งนี้ขึ้นกับระดับความเข้มข้น ชนิดของเกลือ (cation) และสายพันธุ์ของปลา ซึ่งการเติมไบคาร์บอเนตสามารถทดแทนสารประกอบฟอสเฟตได้เพียงบางส่วนเท่านั้น สำหรับซูริมิจากเนื้อปลา Alaska pollock ใช้ $NaHCO_3$ หรือ $NaHCO_3$:$KHCO_3$ (1:1) ทดแทนฟอสเฟตได้สูงสุดร้อยละ 75 สำหรับซูริมิจากเนื้อปลา Pacific whiting ใช้ $NaHCO_3$:$KHCO_3$ (1:1) ทดแทนฟอสเฟตได้ที่ระดับร้อยละ 25

9. Differential Scanning Calorimetry (DSC) (ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย 2549)



ภาพที่ 5 endothermic peak และ exothermic peak

ที่มา: Anonymous (2008)

การวิเคราะห์โดยการใช้ความร้อน(thermal analysis) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ชนิดหนึ่งที่วัดสมบัติทางกายภาพ (physical properties) ของสารต่างๆ เปรียบเทียบกับอุณหภูมิหรือเวลา เทคนิคชนิดนี้ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Differential Scanning Calorimetry หรือเรียกย่อๆว่า DSC ซึ่งวัดอุณหภูมิและ heat flow จากการเปลี่ยนแปลงความร้อน (thermal transition) ของวัสดุเปรียบเทียบกับอุณหภูมิหรือเวลา ทำให้ได้ข้อมูลทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ(qualitative and quantitative) ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมี การเปลี่ยนแปลงนี้จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการดูดหรือคายความร้อน(endothermic or exothermic processes) หรือ การเปลี่ยนแปลงความจุความร้อน(heat capacity changes) โดยเส้นกราฟที่วัดได้จะมี 2 แบบ คือ endothermic peak ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาดูดความร้อน และ exothermic peak ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาคายความร้อนดังภาพที่ 5

Differential Scanning Calorimeter ในปัจจุบันที่ใช้งานอยู่มี 3 ชนิดดังรายละเอียดต่อไปนี้

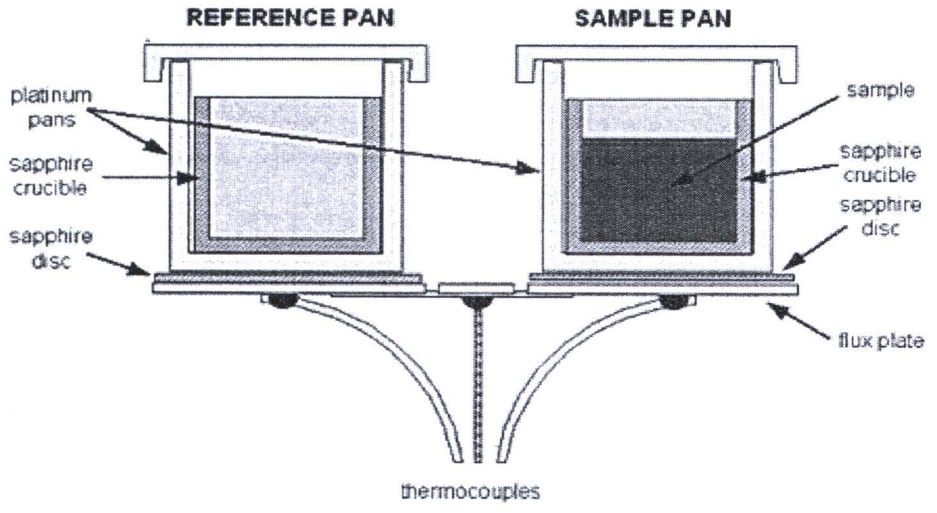
9.1 Heat Flux DSC

Heat Flux DSC (ภาพที่ 6) มีรายละเอียดดังนี้คือ ตัวอย่างถูกบรรจุ (encapsulate) อยู่ใน aluminum pan เรียกว่า sample pan และมี reference pan ซึ่งเป็น aluminum pan ที่ไม่มีตัวอย่าง โดยที่ pan ทั้งสองแบบดังกล่าววางอยู่บน thermoelectric disk ที่อยู่ในเตาให้ความร้อน (Furnace) เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจะทำให้ความร้อนผ่าน thermoelectric disk เข้าไปในตัวอย่างและสารอ้างอิงทำให้เกิดความแตกต่างของ heat flow ที่ตัวอย่างและสารอ้างอิงซึ่งจะวัดโดย thermocouple และการใช้กฎของโอห์ม(Ohm's law) สมการที่ใช้ในการคำนวณ heat flow คือ $q = DT/R$ เมื่อ

q คือ heat flow ของตัวอย่าง

DT คือ ความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างตัวอย่างและสารอ้างอิง

R คือ ความต้านทานของ thermoelectric disk สมการข้างต้นดังกล่าวเป็นone-term equationอย่างง่ายที่ไม่บันทึก heat flow ที่เข้าและออกจาก sensor และ sample pan ทำให้ผลที่ได้ค่อนข้างดีแต่จะมีข้อจำกัดเรื่อง baseline flatness ความไว (sensitivity) และความละเอียดของกราฟ (DSC curve)



ภาพที่ 6 Heat Flux DSC

ที่มา: Anonymous (2008)

9.2 Power Compensation DSC

Power Compensation DSC (ภาพที่ 7) เป็นเครื่องมือที่มีระบบทดพลังงาน โดยให้ความร้อนแก่สารตัวอย่างและสารอ้างอิงแยกกัน ใช้แหล่งให้ความร้อนคนละตัวแล้วควบคุมให้ค่าความแตกต่างของอุณหภูมิเข้าใกล้ศูนย์ ขณะที่วัดความแตกต่างของกำลังไฟฟ้าที่ใช้รักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่เท่ากันไว้ ($q=(d\Delta Q/dt)$)

9.3 DSC ที่ใช้ Tzero Technology

DSC ที่ใช้ Tzero Technology เป็นเทคโนโลยีใหม่ของเครื่อง DSC ที่ได้รับการออกแบบมาโดยเฉพาะเพื่อที่จะวัด heat flow ที่เข้าและออกจากตัวอย่างให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ทำให้วัดค่าต่างๆได้มากขึ้นและให้สมรรถนะที่ดีกว่าในการวัด ทั้งแบบที่ร้อนขึ้น (heating) และแบบที่เย็นลง (cooling) เพราะมีการรวมคุณสมบัติที่ดีที่สุดของการออกแบบ Heat flux และ Power compensation DSC เข้าด้วยกัน

9.4 ส่วนประกอบของเครื่อง

9.4.1 DSC เซ็นเซอร์ (sensor) รวมทั้งเครื่องขยายสัญญาณ

9.4.2 เตาเผาและเครื่องวัดอุณหภูมิ

9.4.3 ระบบตั้งโปรแกรม หรือคอมพิวเตอร์

9.4.5 เครื่องบันทึกสัญญาณ เครื่องพิมพ์ หรืออุปกรณ์ที่ใช้เก็บข้อมูล

9.5 Parameter ที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงความร้อน มีดังนี้

To : Onset temperature (Onset T_d)

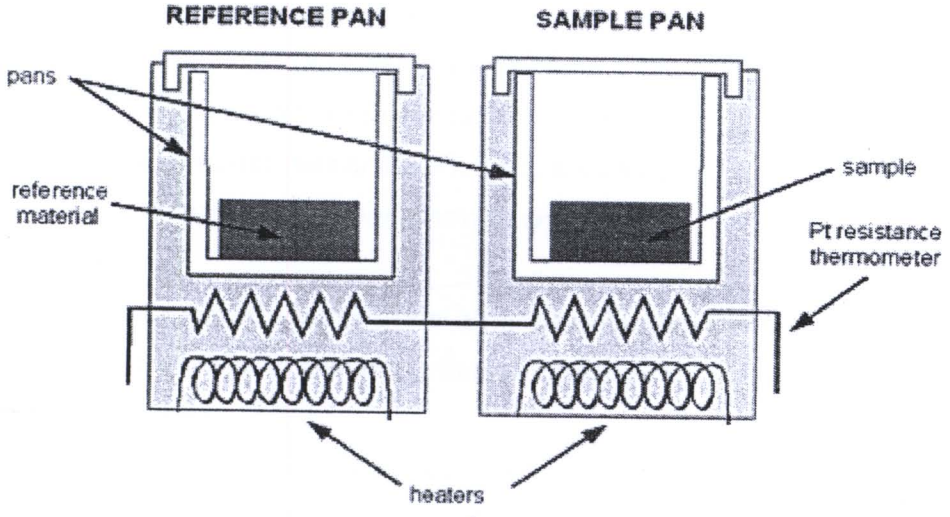
Tc : Conclude temperature

Te : End temperature

Tp : Peak temperature

พื้นที่ใต้กราฟ (Area) : ปริมาณความร้อนทั้งหมดที่ดูดซับ (The total heat absorbed)

ΔH : ปริมาณความร้อนที่ดูดซับต่อกรัมตัวอย่าง



ภาพที่ 7 Power Compensation DSC

ที่มา: Anonymous (2008)