การยับยั้งการย่อยสลายตัวเองและการปรับปรุงคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลที่ผลิตจากปลากรายและปลาสลาดโดยใช้ไข่ขาวผง

Autolysis Inhibition and Improvement of Gel Properties of Clown Featherback (*Chitala ornata*) and Grey Featherback (*Notopterus notopterus*) by Using Egg White Powder

อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์[1*] และ โอรส รักชาติ[2]

Arunluk Chodnakarin[1*] and Orose Rugchati[2]

[1]*สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม*

[2]*ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร*

[1]*Biotechnology Department, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University*

[2]*Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University*

Received : 15 November 2017

Accepted : 12 February 2018

Published online : 15 February 2018

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของการยับยั้งการย่อยสลายตัวเองและการปรับปรุงคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลปลากราย (*Chitala ornata*) และปลาสลาด (*Notopterus notopterus*) โดยใช้ไข่ขาวผง จากการศึกษาพบว่าการย่อยสลายตัวเองของปลากรายและปลาสลาดพบสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายตัวเองของทั้งปลากรายและปลาสลาดพบที่พีเอช 4 และพีเอช 7 การย่อยสลายตัวเองในปลาทั้งสองชนิดถูกยับยั้งด้วย pepstatin A ที่พีเอช 4 และ soybean trypsin inhibitor ที่พีเอช 7 มากที่สุด ($p \leq 0.05$) ดังนั้นเอนไซม์โปรติเนสหลักที่พบในเนื้อปลากรายและปลาสลาดเป็นเอนไซม์กลุ่มแอสพาติกโปรติเนสและซีรีนโปรติเนส เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี TCA-soluble oligopeptide พบว่าการเติมไข่ขาวผงที่ระดับ 3% สามารถยับยั้งอัตราการย่อยสลายตัวเองในเจลปลากรายและปลาสลาดได้ 74% และ 72% ตามลำดับและยังพบว่าทำให้ความเข้มของแถบไมโอซินเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเติมไข่ขาวผงที่ระดับ 2% ทำให้ค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปของเจลปลากรายและปลาสลาดเพิ่มขึ้น ดังนั้นการย่อยสลายตัวเองในปลากรายและปลาสลาดสามารถยับยั้งได้โดยการเติมไข่ขาวผง และการเติมไข่ขาวผงยังสามารถปรับปรุงคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลจากปลาทั้งสองชนิดได้

คำสำคัญ : การย่อยสลายตัวเอง ไข่ขาวผง เอนไซม์โปรติเนส ปลากราย ปลาสลาด

*Corresponding author. E-mail : siriangkanakun@psru.ac.th

Abstract

The objectives of this study were to investigate the effects of autolysis inhibition and to improve gel textural properties of clown featherback (*Chitala ornata*) and grey featherback (*Notopterus notopterus*) by using egg white powder. The highest autolysis was observed at 55 and 70 °C for clown featherback and grey featherback, respectively. The optimum pH for autolysis of both clown featherback and grey featherback was found at 4.0 and 7.0. Pepstatin A and soybean trypsin inhibitor showed the highest inhibition toward autolysis at pH 4 and 7, respectively ($p \leq 0.05$), suggesting that aspartic proteinases and serine proteinases were mainly responsible for degradation in both fish species. Based on TCA-soluble oligopeptide assay, addition of 3% egg white powder showed 74% and 72% inhibition found in gel of clown featherback and grey featherback, respectively with the concomitant increase in band intensity of myosin heavy chain retained. Moreover, addition of 2% egg white powder resulted in an increase of breaking force and deformation of clown featherback and grey featherback gels. Therefore, autolysis of clown featherback and grey featherback can be retarded by the addition of egg white powder leading to an increase of gel textural properties of both fish species.

Keywords : autolysis, egg white powder, proteinases, clown featherback, grey featherback

บทนำ

การย่อยสลายตัวเอง (autolysis) เป็นปัญหาหลักที่มีผลต่อคุณภาพของเจลปลา การย่อยสลายตัวเองเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อปลาตามธรรมชาติ โดยเอนไซม์โปรติเนสจะย่อยสลายโปรตีนหรือโพลีเปปไทด์จนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นหรือกรดอะมิโนส่งผลให้สูญเสียโครงข่ายของเจลในระหว่างการให้ความร้อน ทำให้ผลิตภัณฑ์ปลาที่ได้มีลักษณะนิ่มเละ ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งชนิดของเอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อปลาจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ปลา โดยเอนไซม์คาเทปซิน B และ H พบในเนื้อปลาบดของปลาแปซิฟิก ไวทิง (Pacific whiting) (An *et al.,* 1994) เอนไซม์คาเทปซิน B และ L เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เจลปลาชุมแซลมอน (chum salmon) อ่อนตัวลง (Yamashita & Konagaya, 1991) นอกจากนี้เอนไซม์ซีรีนโปรติเนสยังเป็นเอนไซม์หลักที่ส่งผลให้เกิดการอ่อนตัวของเจลปลาทรายแดง (threadfin bream) และปลาโอวัลไฟล์ (oval-filefish) (Toyohara & Shimizu, 1988; Toyohara *et al.,* 1990) เพื่อที่จะลดปัญหาการอ่อนตัวของเจลปลาและปรับปรุงคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลปลา การเติมสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสน่าจะเป็นแนวทางในการแก้ปัญหา

สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสที่ใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อปลาบด ได้แก่ โปรตีนพลาสมาจากเลือดวัว (beef plasma protein) มันฝรั่งสกัด (potato extract) โปรตีนเวย์ (whey protein concentrate) และไข่ขาวผง (egg white powder) เป็นต้น อย่างไรก็ตามปริมาณการใช้โปรตีนพลาสมาจากเลือดวัวลดลงอย่างมากเนื่องจากปัญหาของโรควัวบ้า (Yongswatdigul & Piyadhammaviboon, 2004) ขณะที่เมื่อเติมโปรตีนจากมันฝรั่งสกัดจะส่งผลให้เนื้อปลาบดมีปัญหาเรื่องสีทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Akazawa *et al.,* 1993) โปรตีนเวย์และไข่ขาวผงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสได้ดีส่งผลให้คุณภาพทางเนื้อสัมผัสของเจลปลาเพิ่มขึ้น ได้มีการรายงานว่าไข่ขาวผงสามารถยับยั้งกิจกรรม

ของเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนหมูได้มากกว่าโปรตีนเวย์และโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (Siriangkanakun & Yongsawatdigul, 2012) Yongswatdigul & Piyadhammaviboon (2004) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของการใช้ไข่ขาวผงและโปรตีนเวย์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในซูริมิปลาปากคม (lizardfish) โดยพบว่าการเติมไข่ขาวผงและโปรตีนเวย์ที่ระดับ 1% สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสจากซูริมิปลาปากคมได้ 57% และ 30% ตามลำดับ นอกจากนี้การเติมไข่ขาวผงที่ระดับ 1% ส่งผลให้ค่าแรงกด (breaking force) และค่าระยะการเปลี่ยนรูป (deformation) ของเจลซูริมิปลาปากคมเพิ่มขึ้นถึงสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับซูริมิปลาปากคมที่เติมโปรตีนเวย์และที่ไม่ได้เติมสารยับยั้งใด ๆ นอกจากไข่ขาวผงสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสได้แล้วไข่ขาวผงยังมีคุณสมบัติในการเกิดเจลได้ด้วยตัวมันเอง (Li *et al.,* 2007) ดังนั้นการเติมไข่ขาวผงลงไปในเนื้อปลาบดอาจจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสลดลงและยังทำให้คุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลปลาเพิ่มขึ้น

ปลากราย (*Chitala ornata*) เป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่พบมากในแถบประเทศไทย อินโดนีเซีย อินเดีย มาเลเซีย และพม่า ในประเทศไทยพบปลากรายอาศัยในแม่น้ำลำคลอง หนอง และบึงทั่วประเทศ ปลาชนิดนี้นิยมนำมาบริโภคเนื่องจากมีรสชาติอร่อย เนื้อปลามีเนื้อสัมผัสที่เหนียว สามารถนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารได้หลายชนิด เช่น ลูกชิ้นปลากราย ทอดมันปลากราย เป็นต้น ปลากรายที่นำมาจำหน่ายส่วนใหญ่เป็นปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งพบว่ามีปริมาณลดลงทุกปี (Lopburi inland fisheries development center, 2017) ดังนั้นจึงทำให้ผู้ประกอบการจำเป็นต้องหาปลาชนิดอื่นมาทดแทนปลากราย ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้ปลาสลาด (*Notopterus notopterus*) เนื่องจากให้รสชาติอร่อยและมีเนื้อสัมผัสที่เหนียวคล้ายกับปลากราย การนำเนื้อปลากรายและเนื้อปลาสลาดมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ มักใช้เนื้อปลาที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำจึงทำให้เอนไซม์โปรติเนสที่อยู่ในส่วนของโปรตีนไมโอไฟบิลลาร์และโปรตีนซาร์โคพลาสมิกไม่ถูกกำจัดออก ซึ่งอาจจะส่งผลให้เนื้อปลากรายและเนื้อปลาสลาดบดมีปัญหาเกี่ยวกับย่อยสลายตัวเองจากเอนไซม์โปรติเนสส่งผลต่อคุณภาพทางเนื้อสัมผัสของเจลปลาทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับการยับยั้งการย่อยสลายตัวเองและการปรับปรุงคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลปลากรายและปลาสลาดโดยใช้ไข่ขาวผงยังคงไม่มีการศึกษา การเข้าใจธรรมชาติของปลาน้ำจืดเหล่านี้อาจทำให้สามารถปรับปรุงคุณภาพทางเนื้อสัมผัสของเจลปลากรายและปลาสลาดได้ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำปลากรายและปลาสลาดมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาผลของการยับยั้งการย่อยสลายตัวเองและการปรับปรุงคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลปลากรายและปลาสลาดโดยใช้ไข่ขาวผง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างปลา

ซื้อปลากราย (clown featherback, *Chitala ornata*) และปลาสลาด (grey featherback, *Notopterus notopterus*) มาจากตลาดปลาน้ำจืด อำเภอกงไกรลาส จังหวัดสุโขทัย โดยปลาทั้ง 2 ชนิดมีน้ำหนักตัวอยู่ในช่วง 1.0-1.5 กิโลกรัม จัดเก็บปลาภายในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งและขนส่งมาที่ห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก ภายในระยะเวลา 30 นาที เมื่อขนส่งมาถึงห้องปฏิบัติการ ปลากรายและปลาสลาดถูกล้างด้วยน้ำเย็น จากนั้นนำไปแล่และเอาเฉพาะส่วนเนื้อมาบดโดยใช้เครื่องบดเนื้อ บรรจุเนื้อบดที่ได้ในถุงโพลีเอธิลีนถุงละ 1 กิโลกรัม ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างมาศึกษาภายใน 2 เดือน

การศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อการย่อยสลายตัวเอง

ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลากรายและปลาสลาด โดยใช้วิธีของ Yongsawatdigul & Piyadhammaviboon (2004) โดยชั่งเนื้อปลาบดจำนวน 3 กรัม บ่มตัวอย่างในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 0 25 30 40 50 55 60 65 70 75 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วย trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น 5% จำนวน 27 มิลลิลิตร โฮโมจีไนซ์ตัวอย่างเป็นเวลา 1 นาทีและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณ TCA-soluble oligopeptides ด้วยวิธีของ Lowry *et al*. (1951) โดยใช้ L-tyrosine เป็นสารมาตรฐาน กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองจะแสดงในหน่วย nmol of tyrosine/mg protein/h

ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองโดยชั่งตัวอย่างปลา 3 กรัม จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยช่วงพีเอช 2-7 เติมบัฟเฟอร์ mcIlvaines เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ช่วงพีเอช 8-9 เติมบัฟเฟอร์ tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ และช่วงพีเอช 10-11 เติมบัฟเฟอร์ glycine-NaOH เข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มตัวอย่างโดยเลือกอุณหภูมิที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสสูงที่สุดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย TCA เข้มข้น 7.5% ปริมาตร 18 มิลลิลิตร โฮโมจีไนซ์ตัวอย่างเป็นเวลา 1 นาทีและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณ TCA-soluble oligopeptides ด้วยวิธีของ Lowry *et al*. (1951) ดังวิธีการข้างต้น

การศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนสต่อการย่อยสลายตัวเอง

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม เติมบัฟเฟอร์โดยเลือกพีเอชที่มีกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองสูง จากนั้นเติมสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสโดยให้สารยับยั้งมีความเข้มข้นสุดท้ายคือ soybean trypsin inhibitor (STI) เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butane (E-64) เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ethylenediaminetetraacetic disodium salt (EDTA) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ pepstatin A เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ บ่มตัวอย่างโดยเลือกอุณหภูมิที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสสูงที่สุดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วย TCA เข้มข้น 7.55% ปริมาตร 18 มิลลิลิตร โฮโมจีไนซ์ตัวอย่างเป็นเวลา 1 นาทีและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณ TCA-soluble oligopeptides ด้วยวิธีของ Lowry *et al*. (1951) โดยใช้ L-tyrosine เป็นสารมาตรฐาน ระดับการยับยั้งเอนไซม์โปรติเนสคำนวณดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(TC-TC_b)-(TI-TI_b)]/(TC-TC_b) \times 100$$

โดย TC = ปริมาณ TCA- soluble oligopeptide ของตัวอย่างควบคุม (ไม่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนส) บ่มที่อุณหภูมิที่แสดงค่ากิจกรรมสูงที่สุด TC_b = ปริมาณ TCA- soluble oligopeptide ของตัวอย่างควบคุม (ไม่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนส) บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส TI = ปริมาณ TCA- soluble oligopeptide ของตัวอย่าง (มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนส) บ่มที่อุณหภูมิที่แสดงค่ากิจกรรมสูงที่สุด TI_b = ปริมาณ TCA- soluble oligopeptide ของตัวอย่าง (มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนส) บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

การเตรียมเจล

นำเนื้อปลาบดจากปลาแต่ละชนิดมาสับผสมกับเกลือ 2% โดยน้ำหนักทั้งหมด ทำการปรับปริมาณความชื้นของเนื้อปลาบดเป็น 80% และเติมไข่ขาวผงแห้งที่ระดับ 0 1 2 และ 3% โดยน้ำหนักทั้งหมด ทำการสับผสมโดยใช้เครื่อง Stephan vacuum cutter (UM5, Stephan Machinery Co., Columbus, OH, USA) สับผสมเป็นเวลา 6 นาทีโดยควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 12 องศาเซลเซียส จากนั้นบรรจุตัวอย่างลงในไส้พลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร และบ่มตัวอย่างที่สภาวะต่าง ๆ คือ (1) เซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (2) เซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (3) เซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่มีสภาวะการบ่มดังข้อที่ (1)-(3) ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (4) เปรียบเทียบกับการให้ความร้อนโดยตรงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาให้แช่ตัวอย่างในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที และเก็บตัวอย่างข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การศึกษาผลของการเติมไข่ขาวผงต่อการย่อยสลายตัวเองของเจลโดยวิธี TCA-soluble oligopeptide

วิเคราะห์การเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อเนื่องจากเอนไซม์โปรติเนสโดยใช้วิธีของ Yongsawatdigul & Piyadhammaviboon (2004) โดยนำตัวอย่างเจลที่บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ จำนวน 3 กรัม เติม TCA เข้มข้น 5% จำนวน 27 มิลลิลิตร โฮโมจีไนซ์ตัวอย่างเป็นเวลา 1 นาทีและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณ TCA-soluble oligopeptides ด้วยวิธีของ Lowry *et al*. (1951) โดยใช้ L-tyrosine เป็นสารมาตรฐาน แสดงค่ากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองในหน่วย μmol/g

การศึกษาผลของการเติมไข่ขาวผงต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของเจล

นำตัวอย่างเจลจากปลากรายและปลาสลาดออกมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตัดเจลเป็นท่อนให้มีความยาว 3.0 เซนติเมตร นำตัวอย่างมาตรวจวัดลักษณะเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง texture analyzer (TA-XT2, Stable Micro System, Surrey, England) ใช้หัววัด spherical probe ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร อัตราเร็วในการกด 1 มิลลิเมตรต่อวินาที รายงานผลเป็นค่าแรงกด (breaking force) และค่าระยะการเปลี่ยนรูป (deformation) ซึ่งค่าแรงกด (breaking force) เป็นแรงสูงที่สุดที่ใช้ในการเจาะทะลุตัวอย่าง มีหน่วยเป็นกรัม และค่าระยะการเปลี่ยนรูป (deformation) เป็นระยะทางที่หัววัดเคลื่อนที่จากผิวหน้าตัวอย่างจนเจาะทะลุ มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส (SDS-PAGE)

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลาบดที่ไม่ได้บ่มที่อุณหภูมิใด ๆ และไม่ได้เติมไข่ขาวผง (raw paste) และตัวอย่างเจลที่บ่มที่อุณหภูมิที่แสดงการย่อยสลายตัวเองสูงที่สุดและมีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปต่ำที่สุดจำนวน 2 กรัม จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulfate) เข้มข้น 5% ปริมาตร 18 มิลลิลิตร โฮโมจีไนซ์ตัวอย่างเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายส่วนใสด้วยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน แสดงค่าปริมาณโปรตีนในหน่วย mg/ml และวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยใช้ polyacrylamide เข้มข้น 10% ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยนำสารละลายส่วนใสผสมกับ treatment buffer (Tris-HCl เข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.8, SDS เข้มข้น 4%, glycerol เข้มข้น 20%, ß-mercaptoethanol เข้มข้น 10% และ

bromophenol blue เข้มข้น 0.1%) ด้วยอัตราส่วน 1:1 ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ ย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้น 0.125% และล้างสีออกด้วย ethanol เข้มข้น 25% และกรด acetic เข้มข้น 10%

การศึกษาความขาวของเจล

วัดค่าสีของเจลปลากรายและปลาสลาดด้วยเครื่อง colorimeter (CR 300, Minolta Corp., Osaka, Japan) โดยใช้ระบบ CIE L* a* b* คำนวณค่าความขาวตามสูตรของ Lanier (1992)

$$\text{Whiteness} = 100-[(100-L^*)^2+a^{*2}+b^{*2}]^{1/2}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปในการคำนวณทางสถิติ

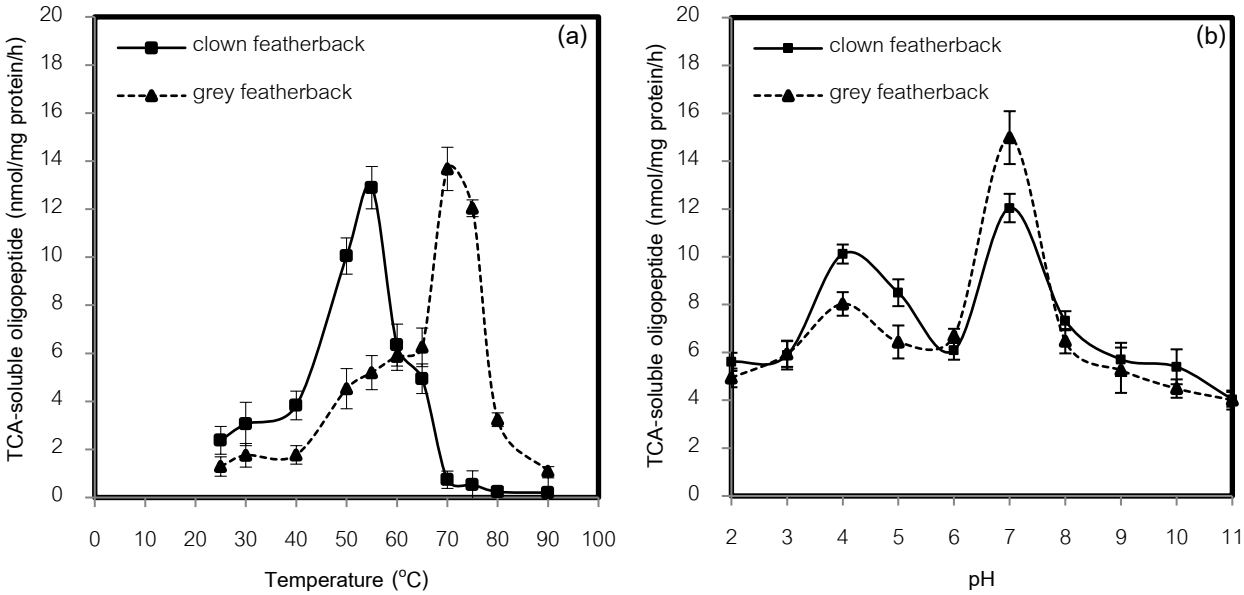
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อการย่อยสลายตัวเอง

การย่อยสลายตัวเองของปลากรายและปลาสลาดเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นโดยศึกษาจากปริมาณ TCA- soluble oligopeptide ที่เกิดขึ้นในปลาแต่ละชนิด การย่อยสลายตัวเองของปลากรายและปลาสลาดพบสูงที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาพที่ 1a) จากผลนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเนสที่พบในปลาทั้งสองชนิดเป็นเอนไซม์โปรติเนสชนิดทนความร้อน มีรายงานว่าปลาปากคม (lizardfish) และปลาหนวดฤาษี (goatfish) มีการย่อยสลายตัวเองสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 65 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Yongswatdigul & Piyadhammaviboon, 2004; Yarnpakdee *et al.,* 2009) ในขณะที่ปลานิล (tilapia) และปลานวลจันทร์ (small scale mud carp) มีการย่อยสลายตัวเองสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 65 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Yongswatdigul *et al*., 2000; Yongsawatdigul *et al*., 2006) เมื่อให้ความร้อนกับปลากรายและปลาสลาดที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อปลาทั้งสองชนิดถูกทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อนเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูง จึงไม่สามารถย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาให้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ ได้ ส่งผลให้อัตราการย่อยสลายตัวเองลดลง

ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาบดโดยบ่มเนื้อปลากรายและปลาสลาดบดที่พีเอช 2-11 ภายใต้อุณหภูมิ 55 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่แสดงกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองสูงที่สุดในปลาแต่ละชนิด จากผลการทดลองพบว่าปลากรายและปลาสลาดที่บ่มที่พีเอช 7 มีปริมาณ TCA-soluble oligopeptide สูงที่สุด รองลงมาคือพีเอช 4 (ภาพที่ 1b) ดังนั้นเอนไซม์โปรติเนสที่มีผลทำให้ปลากรายและปลาสลาดมีการย่อยสลายตัวเองสูงคือเอนไซม์ในกลุ่มนิวทรัลโปรติเนส (neutral proteinases) และแอซิดโปรติเนส (acid proteinases) ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับรายงานของ Yarnpakdee *et al.* (2009) ที่ได้รายงานว่าปลาหนวดฤาษี (goatfish) มีการย่อยสลายตัวเองสูงที่พีเอช 4 และ 7 ในขณะที่เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญทำให้ปลาสวาย (striped catfish) มีการย่อยสลายตัวเองสูงเป็นเอนไซม์

ในกลุ่มแอซิดโปรติเนสและอัลคาไลน์โปรติเนสเนื่องจากพบการย่อยสลายตัวเองสูงที่พีเอช 4 และ 9 (Tadpitchayangkoon & Yongsawatdigul, 2009)



ภาพที่ 1 ผลของอุณหภูมิ (a) และพีเอช (b) ที่มีต่อการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลากรายและปลาสลาด โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนสต่อการย่อยสลายตัวเอง

สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนสที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้คือ STI E-64 EDTA และ pepstatin A ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรติเนส (serine proteinases) ซิสติอีนโปรติเนส (cysteine proteinases) เมทาโลโปรติเนส (metallo proteinases) และแอสพาติกโปรติเนส (aspartic proteinases) ตามลำดับ จากตารางที่ 1 พบว่าเมื่อบ่มเนื้อปลากรายและปลาสลาดบดที่พีเอช 4 สารยับยั้ง pepstatin A มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งอื่น ๆ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่เมื่อบ่มเนื้อปลาทั้งสองชนิดที่พีเอช 7 พบว่าสารยับยั้ง STI มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุด ($p \leq 0.05$) โดยปกติเอนไซม์ซีรีนโปรติเนสจะแสดงกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้ดีในช่วงพีเอช 7-11 (Sriket, 2014) และเอนไซม์กลุ่มซีรีนโปรติเนสสามารถพบได้ทั้งในส่วนของโปรตีนไมโอไฟบิลลาร์และโปรตีนซาร์โคพลาสมิก (Wongwichian *et al.*, 2016) จากผลนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเนสที่พบในเนื้อปลากรายและปลาสลาดเป็นเอนไซม์กลุ่มแอสพาติกโปรติเนสและซีรีนโปรติเนส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Klomklao *et al.* (2008) ที่ได้รายงานว่าเอนไซม์โปรติเนสที่ทำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองในปลาซาร์ดีน (true sardine) เป็นเอนไซม์กลุ่มแอสพาติกโปรติเนสและซีรีนโปรติเนสเนื่องจากถูกยับยั้งด้วย pepstatin A และ STI เมื่อบ่มที่พีเอช 3 และ 9 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพีเอชโดยธรรมชาติของเนื้อปลาบดจะอยู่ที่ประมาณ 7 ดังนั้นในสภาวะธรรมชาติของเนื้อปลากรายและปลาสลาดบดอาจจะเป็นสภาวะที่จะเกิดการย่อยสลายตัวเองในโปรตีนกล้ามเนื้อจากเอนไซม์ซีรีนโปรติเนสเป็นส่วนใหญ่

ตารางที่ 1 ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนสต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลากรายและปลาสลาด

Inhibitors	Degree inhibition (%)			
	clown featherback		grey featherback	
	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7
Control	0	0	0	0
STI	29.26 ± 1.15[b]	72.01 ± 2.86[a]	21.48 ± 2.05[b]	79.35 ± 3.32[a]
E-64	12.04 ± 1.91[c]	21.93 ± 1.95[b]	9.29 ± 1.03[c]	27.91 ± 1.47[b]
EDTA	5.39 ± 0.94[d]	4.72 ± 1.27[d]	9.63 ± 2.74[c]	6.58 ± 1.28[d]
pepstatin A	62.98 ± 3.41[a]	13.81 ± 2.75[c]	56.97 ± 2.26[a]	19.04 ± 0.86[c]

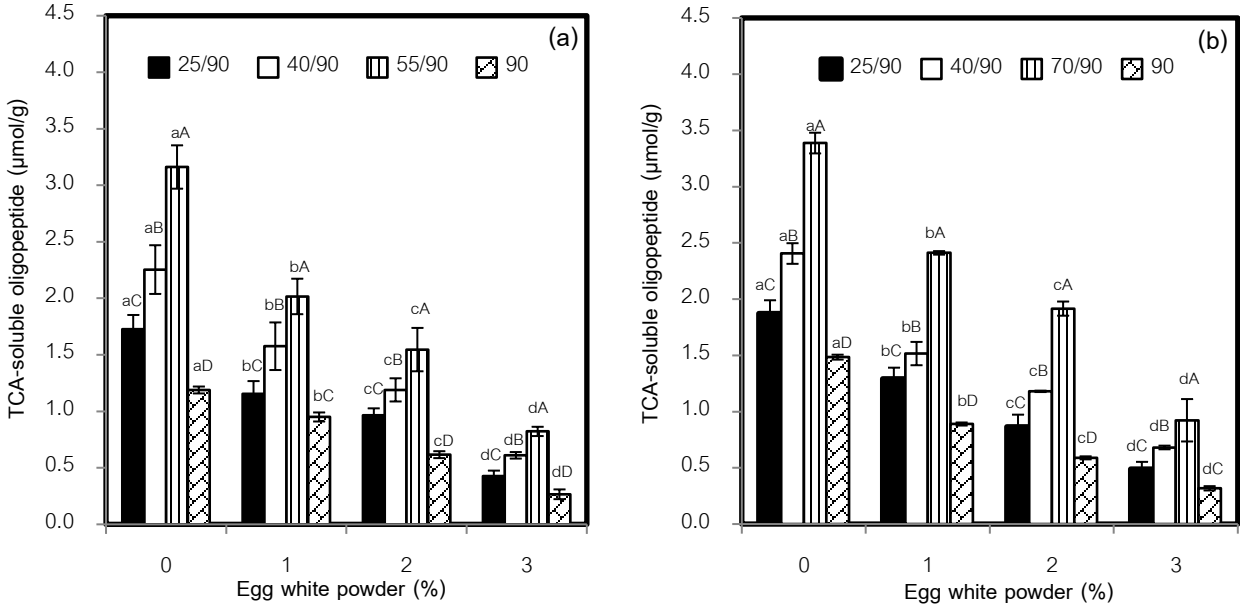
[ab] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลของการเติมไข่ขาวผงต่อการย่อยสลายตัวเองของเจลโดยวิธี TCA-soluble oligopeptide

การศึกษาการย่อยสลายตัวเองของเจลจากปลากรายและปลาสลาดโดยวัดค่า TCA-soluble oligopeptide ในสภาวะที่ไม่เติมและเติมไข่ขาวผง จากผลการทดลองพบว่าปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ในปลาทั้งสองชนิดสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นและปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ในเจลปลากรายและปลาสลาดพบสูงที่สุดเมื่อเจลถูกเซ็ทตัวที่อุณหภูมิ 55 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 2) ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์โปรติเนสมักแสดงกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อนและจะแสดงกิจกรรมได้สูงในช่วงอุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส (Visessanguan *et al.,* 2001) อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนโดยตรงกับเจลที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสทำให้มีปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ต่ำที่สุด ($p \leq 0.05$) เนื่องจากเอนไซม์โปรติเนสเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิสูงจึงทำให้ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อโดยเอนไซม์โปรติเนสมีอยู่ต่ำ และส่งผลให้มีปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ต่ำกว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิอื่น ๆ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายตัวเองดังภาพที่ 1a

การเติมไข่ขาวผงและบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทำให้ปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ของเจลปลากรายและปลาสลาดต่ำกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมไข่ขาวผง เมื่อเปรียบเทียบในสภาวะการบ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ($p \leq 0.05$) ปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ในเจลปลากรายและปลาสลาดลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อปริมาณไข่ขาวผงเพิ่มมากขึ้น จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไข่ขาวผงสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในเจลปลากรายและปลาสลาดได้ นอกจากนี้การเติมไข่ขาวผงที่ระดับ 3% และเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 55 และ 70 องศาเซลเซียสสำหรับปลากรายและปลาสลาด ตามลำดับ สามารถลดปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ในเจลปลากรายและปลาสลาดได้ 74% และ 72% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเจลที่บ่มภายใต้อุณหภูมิเดียวกันโดยไม่เติมไข่ขาวผง ขณะที่การเติมไข่ขาวผงที่ 3% และเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสสามารถลดอัตราการย่อยสลายตัวเองในเจลปลาปากคม (lizardfish) ได้ 61% (Benjakul *et al.,* 2004) การที่ไข่ขาวผงสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสได้เนื่องจากไข่ขาวผงมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนส โดยสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรติเนสที่อยู่ในไข่ขาวผงคือโอโวมูคอยด์ (ovomucoid) และโอโวอินฮิบิเตอร์ (ovoinhibitor) สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มซิสติอีนโปรติเนสคือซิสเตติน (cystatin) และสารยับยั้งกิจกรรมของ

เอนไซม์ในกลุ่มแอสพาติกโปรติเนสคือโอโวแมคโครโกลบูลิน (ovomacroglobulin) (Nakamura & Doi, 2000; García-Carreño & Hernández-Cortés, 2000)



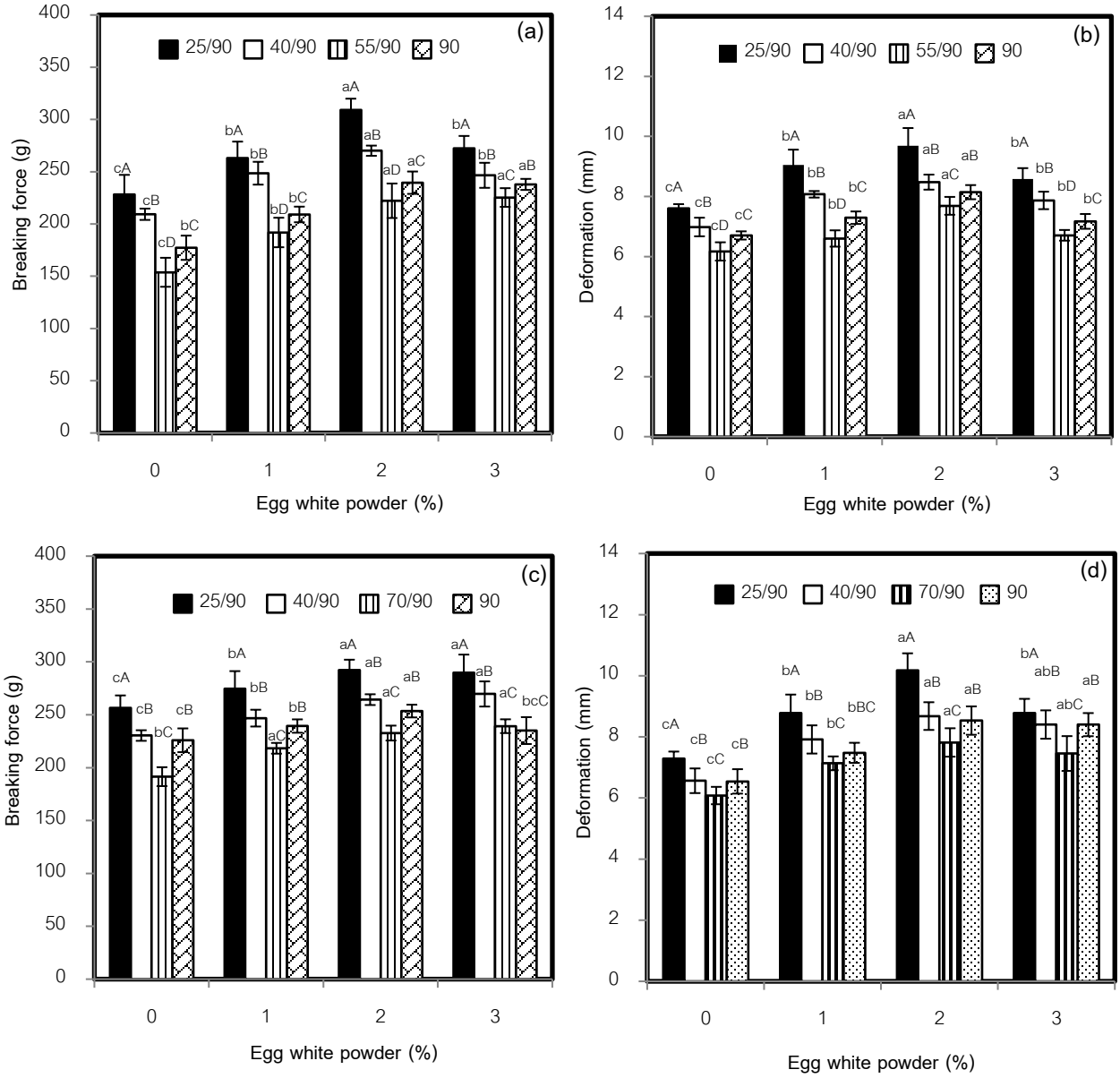
ภาพที่ 2 ปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ของเจลปลากราย (a) และปลาสลาด (b) ที่เติมไข่ขาวผงที่ระดับต่าง ๆ และบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ^{ab}ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันภายใต้สภาวะการบ่มที่อุณหภูมิเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ^{AB}ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันที่ความเข้มข้นของไข่ขาวผงระดับเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลของการเติมไข่ขาวผงต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของเจล

ในสภาวะการเซ็ทตัวของเจลปลากรายที่อุณหภูมิ 25 40 และ 55 องศาเซลเซียส และการเซ็ทตัวของเจลปลาสลาดที่อุณหภูมิ 25 40 และ 70 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการให้ความร้อนโดยตรงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสโดยไม่เติมไข่ขาวผง พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เจลปลากรายและปลาสลาดมีค่าแรงกด (breaking force) และค่าระยะการเปลี่ยนรูป (deformation) สูงที่สุดคือการเซ็ทตัวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 3) ซึ่งค่าแรงกดที่สูงกว่าแสดงถึงความแข็งแรงของโครงสร้างเจลที่มากกว่า และค่าระยะการเปลี่ยนรูปที่สูงกว่าบ่งบอกถึงเจลมีความยืดหยุ่นที่ดีกว่า ทั้งนี้การเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสทำให้เจลมีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปสูงกว่าการเซ็ทเจลที่อุณหภูมิอื่น ๆ อาจเป็นเพราะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสต่ำกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 55 องศาเซลเซียสสำหรับเจลปลากราย (ภาพที่ 1a และ 2a) และต่ำกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 70 องศาเซลเซียสสำหรับเจลปลาสลาด (ภาพที่ 1a และ 2b) นอกจากนี้อาจจะเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อปลา โดยเอนไซม์นี้มีบทบาทในการเชื่อมประสานกันของโปรตีนโดยพันธะ **ε**-(**γ**-glutamyl) lysine ทำให้โครงสร้างของเจลแข็งแรงมากขึ้น (Lee *et al.,* 1997) ดังนั้นเจลที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสน่าจะมีอัตราการเชื่อมประสานกันของโปรตีนมากกว่าอัตราการย่อยสลายด้วย

เอนไซม์โปรติเนส ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Benjakul & Visessanguan (2003) ที่ได้รายงานว่าการเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับปรุงคุณภาพทางเนื้อสัมผัสของปลาตาหวาน (bigeye snapper) การเซ็ทเจลที่อุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปลดลง โดยเฉพาะการเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 55 และ 70 องศาเซลเซียสสำหรับเจลปลากรายและปลาสลาด ตามลำดับ ทำให้เจลปลาทั้งสองชนิดมีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปต่ำที่สุด ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เป็นเพราะอุณหภูมิช่วงนี้เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเนสสามารถทำงานได้ดี (ภาพที่ 1a และ 2) จึงทำให้เอนไซม์โปรติเนสย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทำให้ได้เป็นโพลีเพปไทด์และ/หรือกรดอะมิโน ส่งผลให้สูญเสียโครงข่าย 3 มิติของเจลและทำให้เจลที่ได้มีลักษณะอ่อนตัว เมื่อเจลปลากรายถูกบ่มโดยตรงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พบว่าเจลปลากรายมีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปสูงกว่าการเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แต่ต่ำกว่าเจลที่ถูกเซ็ทที่อุณหภูมิ 25 และ 40 องศาเซลเซียส ($p \leq 0.05$) ขณะที่เจลปลาสลาดที่ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 90 องศาเซลเซียสมีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ถึงแม้ว่าการบ่มเจลที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสจะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเจลที่ถูกบ่มที่อุณหภูมิอื่น ๆ (ภาพที่ 2) ทั้งนี้เป็นเพราะการบ่มเจลที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นการให้ความร้อนโดยตรงโดยปราศจากการเซ็ทตัว ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีการคลายตัวอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้โปรตีนมีแนวโน้มที่จะรวมตัวกันอย่างรวดเร็วและไม่เป็นระเบียบ โครงสร้างเจลที่ได้จึงไม่มีความต่อเนื่องและสม่ำเสมอ น้ำถูกปลดปล่อยออกจากโครงข่ายเจล (Niwa, 1992) เจลที่ได้จึงน่าจะมีความยืดหยุ่นและอุ้มน้ำไว้ได้น้อยกว่าการเซ็ทเจลที่อุณหภูมิอื่น ๆ

การเติมไข่ขาวผงที่ระดับต่าง ๆ ลงในเนื้อปลากรายและปลาสลาดบดทำให้คุณภาพทางเนื้อสัมผัสของเจลปลาทั้งสองชนิดสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมไข่ขาวผงและคุณภาพทางเนื้อสัมผัสของเจลปลาทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อระดับของไข่ขาวผงเพิ่มมากขึ้นจนถึง 2% (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตามการเติมไข่ขาวผงที่ระดับ 3% ไม่ได้ทำให้ค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปของเจลปลาทั้งสองชนิดสูงกว่าเจลปลาที่เติมไข่ขาวผง 2% ถึงแม้ว่าการเติมไข่ขาวผงที่ 3% จะทำให้ปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ในเจลปลากรายและปลาสลาดต่ำกว่าการเติมไข่ขาวผงที่ 2% (ภาพที่ 2) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเติมไข่ขาวผงในระดับที่มากเกินไปจะทำให้ไข่ขาวผงไปขัดขวางการเกิดโครงร่างตาข่าย 3 มิติที่ต่อเนื่องส่งผลให้เจลที่ได้มีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปลดลง Nopianti *et al.* (2011) กล่าวว่าปริมาณไข่ขาวผงที่เหมาะสมในปลาแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับชนิดและคุณภาพของปลา ซูริมิจากปลาแอร์โรว์ทูธ ฟลาวเดอร์ (arrowtooth flounder) และปลาปากคม (lizard) มีคุณภาพทางเนื้อสัมผัสเพิ่มขึ้นเมื่อเติมไข่ขาวผงที่ระดับ 2% และ 3% ตามลำดับ (Reppond & Babbitt, 1993; Benjakul *et al.,* 2004) เจลปลากรายที่เติมไข่ขาวผง 2% และเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำให้มีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปเพิ่มขึ้น 35% และ 27% ตามลำดับ และเมื่อเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทำให้เจลปลากรายมีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปเพิ่มขึ้น 45% และ 25% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่บ่มในสภาวะเดียวกันแต่ไม่เติมไข่ขาวผง ขณะที่ค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปของเจลปลาสลาดเพิ่มขึ้น 14% และ 40% ตามลำดับ เมื่อเติมไข่ขาวผง 2% และเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และการเติมไข่ขาวผง 2% และเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ทำให้เจลปลาสลาดมีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปเพิ่มขึ้น 22% และ 29% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่บ่มในสภาวะเดียวกันแต่ไม่เติมไข่ขาวผง นอกจากไข่ขาวผงมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซโปรติเนสแล้วไข่ขาวผงยังมีคุณสมบัติในการเกิดเจลได้ด้วยตัวมันเอง (Li *et al*., 2007; Lu & Chen, 1999)

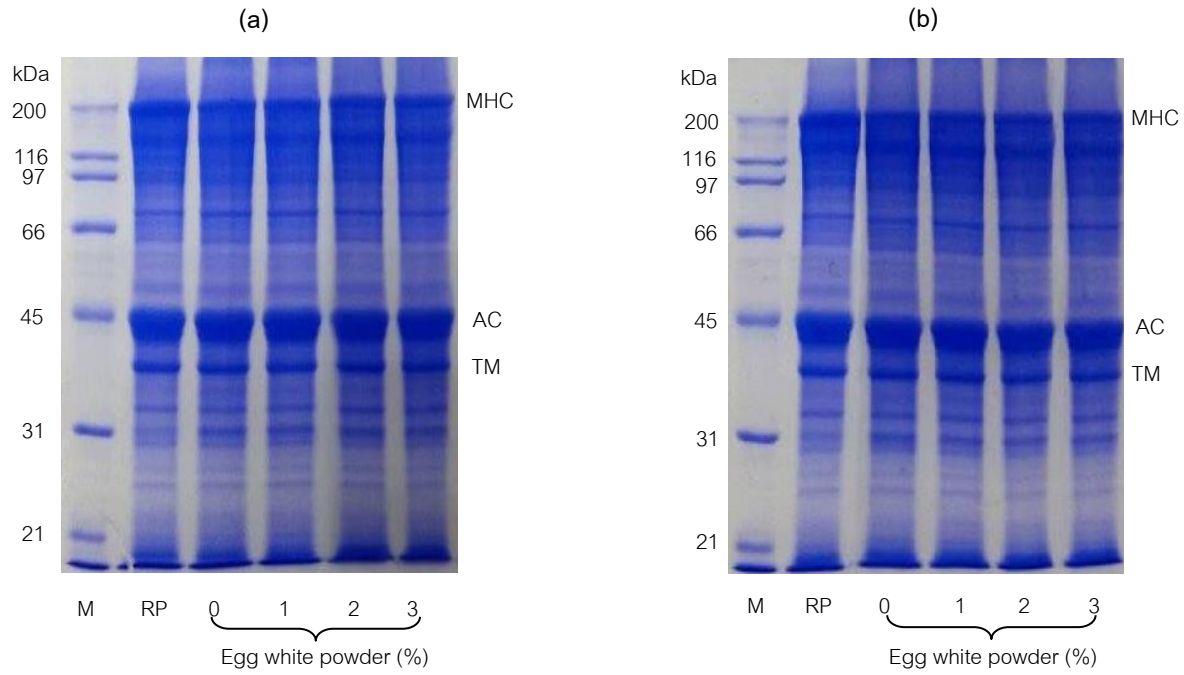


ภาพที่ 3 ค่าแรงกด (a,c) และค่าระยะการเปลี่ยนรูป (b,d) ของเจลปลากราย (a,b) และปลาสลาด (c,d) ที่เติมไข่ขาวผงที่ระดับต่าง ๆ และบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยทำการวัดจำนวน 10 ซ้ำ ^{ab}ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันภายใต้สภาวะการบ่มที่อุณหภูมิเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ^{AB}ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันที่ความเข้มข้นของไข่ขาวผงระดับเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ดังนั้นการที่เจลจากปลาทั้งสองชนิดมีคุณภาพทางเนื้อสัมผัสเพิ่มมากขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสโดยไข่ขาวผงและการเกิดเจลได้ด้วยตัวเองของไข่ขาวผง และปริมาณที่เหมาะสมของไข่ขาวผงที่สามารถปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเจลปลากรายและปลาสลาดคือที่ระดับ 2% และเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ผลการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส (SDS-PAGE)

เนื่องจากเจลจากปลากรายและปลาสลาดที่เซ็ทตัวที่อุณหภูมิ 55 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเจลที่มีอัตราการย่อยสลายตัวเองสูงที่สุดและมีค่าแรงกดและค่าระยะการเปลี่ยนรูปต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิอื่น ๆ (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3) จึงเลือกเจลที่อุณหภูมินี้มาศึกษารูปแบบของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา



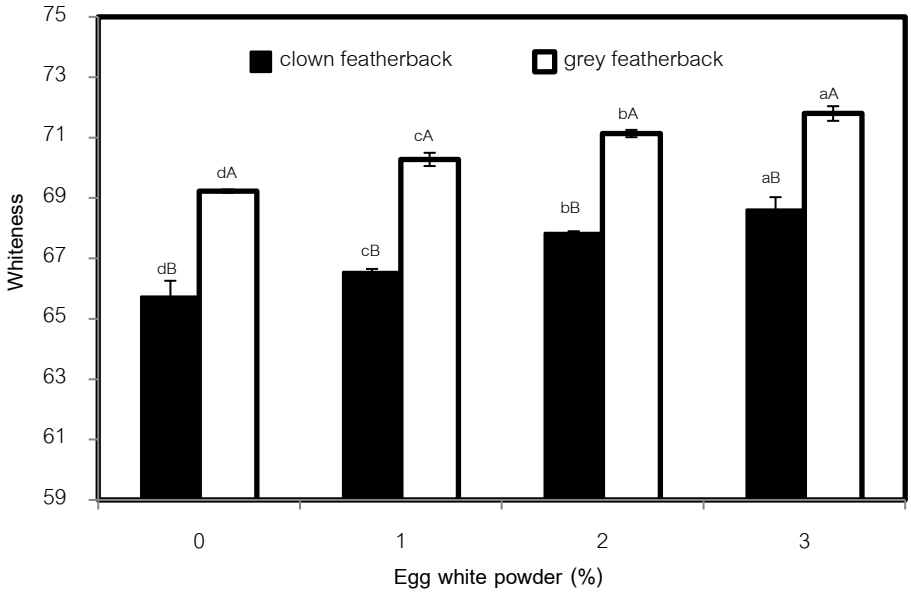
ภาพที่ 4 รูปแบบโปรตีนของเจลปลากราย บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (a) และเจลปลาสลาด บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (b) ที่เติมไข่ขาวผงที่ระดับต่าง ๆ M = โปรตีนมาตรฐาน, RP = เนื้อปลาบดที่ไม่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิใด ๆ และไม่ได้เติมไข่ขาวผง (raw paste), 0 = เจลที่ไม่เติมไข่ขาวผง, 1 = เจลที่เติมไข่ขาวผง 1%, 2 = เจลที่เติมไข่ขาวผง 2%, 3 = เจลที่เติมไข่ขาวผง 3%, MHC = myosin heavy chain, AC = actin, TM = tropomyosin

เมื่อพิจารณารูปแบบโปรตีนของเจลจากปลากรายและปลาสลาดที่ไม่ได้เติมไข่ขาวผงพบว่าความเข้มของแถบไมโอซินเส้นหนัก (myosin heavy chain) ในปลากรายและปลาสลาดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้อปลาบดที่ไม่ได้เติมไข่ขาวผงและไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิใด ๆ (raw paste) ของปลาแต่ละชนิด (ภาพที่ 4) ในขณะที่ความเข้มของแถบแอคติน (actin) และโทรโปไมโอซิน (tropomyosin) ในเจลปลากรายและปลาสลาดที่ไม่เติมไข่ขาวผงไม่แตกต่างจาก raw

paste ทั้งนี้เป็นเพราะซับสเตรตอันดับแรกที่เอนไซม์โปรติเนสจะย่อยคือไมโอซินเส้นหนัก (An *et al.*, 1994) ความเข้มของแถบไมโอซินเส้นหนักที่ลดลงในกรณีที่ไม่เติมไข่ขาวผงมีความสัมพันธ์กับการอ่อนตัวของเจลปลาทั้งสองชนิด (ภาพที่ 3) เนื่องจากไมโอซินเส้นหนักเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ในการเกิดเจล การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนไมโอซินเส้นหนักมีความสัมพันธ์กับการลดลงของคุณภาพเนื้อสัมผัสของเจล (Morrisey *et al.*, 1993) Toyohara & Shimizu (1988) พบว่าการที่เจลจากเนื้อปลาทรายแดงมีคุณภาพต่ำเกิดจากการย่อยสลายของไมโอซินเส้นหนักโดยเอนไซม์โปรติเนส การเติมไข่ขาวผงที่ระดับต่าง ๆ ในเจลปลากรายและปลาสลาดทำให้ความเข้มของแถบไมโอซินเส้นหนักเพิ่มขึ้นเมื่อระดับของไข่ขาวผงเพิ่มขึ้น ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลของอัตราการย่อยสลายตัวเองของเจลที่ลดลง (ภาพที่ 2) และผลของคุณภาพทางเนื้อสัมผัสของเจลปลาที่เพิ่มขึ้นเมื่อเติมไข่ขาวผง (ภาพที่ 3)

ความขาวของเจล

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ไม่มีผลต่อค่าความขาวของเจลปลากรายและปลาสลาด ดังนั้นจึงเลือกรายงานผลของเจลที่เซ็ทตัวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นเจลที่มีคุณภาพทางเนื้อสัมผัสดีที่สุดเมื่อบ่มในสภาวะนี้



ภาพที่ 5 ค่าความขาวของเจลปลากรายและปลาสลาดที่เติมไข่ขาวผงที่ระดับต่าง ๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยทำการวัดจำนวน 5 ซ้ำ ^{ab}ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในปลาชนิดเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) ^{AB}ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันที่ความเข้มข้นของไข่ขาวผงระดับเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

จากผลการศึกษาค่าความขาวของเจลเมื่อเติมไข่ขาวผงพบว่าค่าความขาวของเจลปลากรายและปลาสลาดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อปริมาณไข่ขาวผงเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 5) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเนื้อปลากรายและปลาสลาดบดเป็นเนื้อบดที่

ยังไม่ผ่านกระบวนการล้างด้วยน้ำ จึงทำให้ไมโอโกลบินซึ่งเป็นรงควัตถุในกล้ามเนื้อปลายังไม่ถูกชะล้างออกไป ประกอบกับไข่ขาวผงเป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนสที่มีสีขาวครีม เมื่อไข่ขาวผงผสมกับเนื้อปลากรายและปลาสลาดบดจึงส่งผลให้เจลปลาทั้งสองชนิดมีค่าความขาวเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบค่าความขาวของปลาทั้งสองชนิดพบว่าเจลปลาสลาดมีค่าความขาวสูงกว่าเจลปลากราย ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปลาสลาดอาจจะมีปริมาณไมโอโกลบินน้อยกว่าปลากราย ซึ่งไมโอโกลบินเป็นโปรตีนซาร์โคพลาสมิคที่สามารถละลายได้ในน้ำหรือสารละลายเกลือเจือจาง มีผลต่อการเกิดสีคล้ำของเนื้อปลาและจะส่งผลให้ค่าความขาวของเนื้อปลาบดลดลงตามไปด้วย (Piyadhammaviboon & Yongsawatdigul, 2010; Chen, 2002)

สรุปผลการวิจัย

เอนไซม์โปรติเนสที่เป็นสาเหตุหลักของการย่อยสลายตัวเองในปลากรายและปลาสลาดเป็นเอนไซม์กลุ่มทนความร้อน โดยเอนไซม์โปรติเนสในปลากรายและปลาสลาดทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายตัวเองของปลาทั้งสองชนิดคือพีเอช 4 และ 7 เอนไซม์กลุ่มซีรีนโปรติเนสเป็นสาเหตุหลักทำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองในสภาวะธรรมชาติ การเติมไข่ขาวผงสามารถยับยั้งการย่อยสลายตัวเองและยังทำให้คุณภาพทางเนื้อสัมผัสของเจลปลากรายและปลาสลาดเพิ่มมากขึ้น โดยปริมาณไข่ขาวผงที่เหมาะสมคือ 2% และสภาวะที่เหมาะสมคือเซ็ทเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะให้ความร้อนโดยตรงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การเติมไข่ขาวผงยังส่งผลให้ค่าความขาวของเจลปลาทั้งสองชนิดสูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Akazawa, H., Miyauchi, Y., Sakurada, K., Wasson, D.H., & Reppond, K.D. (1993). Evaluation of protease inhibitors in Pacific whiting surimi. *Journal of Aquatic Food Product Technology, 2,* 79-95.

An, H., Weerasinghe, V., Seymour, T.A., & Morrissey, M.T. (1994). Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi protein. *Journal of Food Science, 59,* 1013-1017.

Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2003). Transglutaminase-mediated setting in bigeye snapper surimi. *Food Research International, 36,* 253-266.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Tueksuban, J., & Tanaka, M. (2004). Effect of some protein additives on proteolysis and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*). *Food Hydrocolloids, 18,* 395-401.

Chen, H.H. (2002). Decoloration and gel-forming ability of horse mackerel mince by air-flotation washing. *Journal of Food Science, 67,* 2970-2975.

García-Carreño, F.L., & Hernández-Cortés, P. (2000). Use of protease inhibitors in seafood products. In N.F. Haard, & B.K. Simpson. (Eds.), *Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality*. (pp. 531-547). New York: Marcel Dekker.

Klomklao, S., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2008). Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*). *Food Chemistry, 107,* 213-220.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227,* 680-685.

Lanier, T.C. (1992). Measurement of surimi composition and functional properties. In T.C. Lanier, & C.M. Lee. (Eds.), *Surimi technology*. (pp. 123-163.). New York: Marcel Dekker.

Lee, H., Lanier, T.C., Hamann, D.D., & Knopp, J.A. (1997). Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *Journal of Food Science, 62,* 20-24.

Li, D.K., Lin, H., & Kim, S.M. (2007). Application of recombinant chum salmon cystatin to Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) surimi to prevent gel weakening. *Journal of Food Science, 72,* C294-C299.

Lopburi inland fisheries development center. (2017). *Clown featherback culture*. Retrieved November 5, 2017, from http://www.fisheries.go.th

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry, 193,* 265-275.

Lu, G.H., & Chen, T.C. (1999). Application of egg white and plasma powders as muscle food binding agents. *Journal of Food Engineering, 42,* 147-151.

Morrisey, M.T., Wu, J.W., Lin, D.D., & An, H. (1993). Protease inhibitor effects on torsion measurements and autolysis of Pacific whiting surimi. *Journal of Food Science, 58,* 1050-1054.

Nakamura, R., & Doi, E. (2000). Egg processing. In S. Nakai, & H.W. Modler. (Eds.), *Food protein processing and application.* (pp. 171-207). New York: Wiley-VCH.

Niwa, E. (1992). Chemistry of surimi gelation. In T.C. Lanier, & C.M. Lee. (Eds.), *Surimi technology*. (pp. 389-427). New York: Marcel Dekker.

Nopianti, R., Huda, N., & Ismail., N. (2011). A review on the loss of the functional properties of proteins during frozen storage and the improvement of gel-forming properties of surimi. *American Journal of Food Technology, 6,* 19-30.

Piyadhammaviboon, P., & Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase inhibitory activity of sarcoplasmic proteins from threadfin bream (*Nemipterus* spp.). *Journal of the Science of Food and Agriculture, 90,* 291-298.

Reppond, K.D., & Babbitt, J.K. (1993). Protease inhibitors affect physical properties of arrowtooth flounder and walleye pollock surimi. *Journal of Food Science, 58,* 96-98.

Siriangkanakun, S., & Yongsawatdigul, J. (2012). Trypsin inhibitory activity and gel-enhancing effect of sarcoplasmic proteins from common carp. *Journal of Food Science, 77,* C1124-C1130.

Sriket, C. (2014). Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal, 21,* 433-445.

Tadpitchayangkoon, P., & Yongsawatdigul, J. (2009). Comparative study of washing treatments and alkali extraction on gelation characteristics of striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) muscle protein. *Journal of Food Science, 74,* C284-C291.

Toyohara, H., Sakata, T., Yamashita, T., Kinishita, M., & Shimizu, Y. (1990). Degradation of oval-filefish meat gel caused by myofibrillar proteinase(s). *Journal of Food Science, 55,* 364-368.

Toyohara, H., & Shimizu, Y. (1988). Relation between the modori phenomenon and myosin heavy chain breakdown in threadfin-bream gel. *Agricultural and Biological Chemistry, 52,* 255-257.

Visessanguan, W., Menino, A.R., Kim, S.M., & An, H. (2001). Cathepsin L: A Predominant heat-activated proteinase in arrowtooth flounder muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49,* 2633-2640.

Wongwichian, C., Chaijan, M., Panpipat, W., Klomklao, S., & Benjakul, S. (2016). Autolysis and characterisation of sarcoplasmic and myofibril associated proteinases of oxeye scad (*Selar boops*) muscle. *Journal of Aquatic Food Product Technology, 25,* 1132-1143.

Yamashita, M., & Konagaya, S. (1991). Proteolysis of muscle proteins in the extensively softened muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi, 57,* 2163.

Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kijroongrjana, K. (2009). Autolysis of goatfish (*Mulloidichthys martinicus*) mince: Characterisation and effect of washing and skin inclusion. *Food Chemistry, 114,* 1339-1344.

Yongsawatdigul, J., Park, J.W., Virulhakul, P., & Viratchakul, S. (2000). Proteolytic degradation of tropical tilapia surimi. *Journal of Food Science, 65,* 129-133.

Yongswatdigul, J., & Piyadhammaviboon, P. (2004). Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. *Food Chemistry, 87,* 447-455.

Yongsawatdigul, J., Piyadhammaviboon, P., & Singchan, K. (2006). Gel-forming ability of small scale mud carp (*Cirrhiana microlepis*) unwashed and washed mince as related to endogenous proteinases and transglutaminase activities. *European Food Research and Technology, 223*, 769-774.