



การศึกษาดัชนีคุณภาพของหมึกกล้วย และหมึกกระดองระหว่างการเก็บรักษา
โดยการแช่ในน้ำแข็ง และการแช่เยือกแข็ง
Study on Quality Indices of Squid (*Photololigo duvaucelii*) and Cuttlefish
(*Sepia aculeata*) during Iced and Frozen Storage

อดิสรา ตันตสุทธิกุล

Adisara Tantasuttikul

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Food Technology
Prince of Songkla University

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาดัชนีคุณภาพของหมึกกล้วย และหมึกกระดองระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่ในน้ำแข็ง และการแช่เยือกแข็ง

ผู้เขียน นางสาวอศิรา ตันตสุทธิกุล

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ก่องกาญจน์ กิจรุ่งโรจน์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณี วิทยานนท์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ดร.อมรรัตน์ ถนนแก้ว)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สุทษวัฒน์ เบญจกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ก่องกาญจน์ กิจรุ่งโรจน์)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สุทษวัฒน์ เบญจกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
สำหรับการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
อาหาร

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาดัชนีคุณภาพของหมึกกล้วย และหมึกกระดองระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่ในน้ำแข็ง และการแช่เยือกแข็ง
ผู้เขียน	นางสาวอดิศรา ดันตสุทธิกุล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของหมึกกล้วย (*Photololigo duvaucelii*) และหมึกกระดอง (*Sepia aculeata*) ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 16 วัน พบว่า ปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมด แอมโมเนีย และปริมาณน้ำที่ออกจากกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ปริมาณไตรเมทิลเอมีนของหมึกกล้วยและหมึกกระดองเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 10 และวันที่ 8 ของการเก็บรักษาในน้ำแข็ง ตามลำดับ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาหมึกกล้วยมีปริมาณจุลินทรีย์ต่ำกว่า 10^6 cfu ต่อกรัมตัวอย่าง ค่าความสว่าง (L^*) ของหมึกทั้งสองชนิดลดลง ($p < 0.05$) ค่าสีแดง (a^*) มีค่าเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยหมึกกล้วยมีค่าสูงกว่าหมึกกระดอง แสดงให้เห็นว่ามีการย้อมติดสีแดงเพิ่มขึ้นบนเนื้อหมึกกล้วย ค่าสีเหลือง (b^*) ของหมึกกล้วยลดลง ส่วนหมึกกระดองมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ($p < 0.05$) นอกจากนี้การเก็บรักษาในน้ำแข็งมีผลทำให้ค่าแรงเนียนของหมึกทั้งสองชนิดแบบสดและแบบต้มมีค่าลดลง ($p < 0.05$) เนื่องจากเกิดการย่อยสลายของโปรตีนไมโอซินเส้นหนัก ดังแสดงจาก sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และปริมาณเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกที่เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางจุลภาคแสดงให้เห็นการคลายตัวและเกิดช่องว่างของเส้นใยกล้ามเนื้อ รวมทั้งไม่ปรากฏโครงข่ายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน คะแนนจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยวิธี quality index method (QIM) มีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่คุณภาพโดยรวมมีคะแนนลดลง ($p < 0.05$) โดยพบว่าหมึกทั้งสองชนิดมีอายุการเก็บรักษา 6 วัน การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ มีความสัมพันธ์กับการทดสอบทางประสาทสัมผัสมากที่สุด ($p < 0.05$) และสามารถเป็นดัชนีความสดของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง ($\alpha = 0.01$)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหมึกกล้วยและหมึกกระดองในระหว่างการเก็บรักษาโดยวิธีแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่า

ค่า thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ของหมึกทั้งสองชนิดมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ($p < 0.05$) โดยวิธีการแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นมีการเปลี่ยนแปลงสูงกว่าแบบแผ่นสัมผัส ($p < 0.05$) ระหว่างการเก็บรักษา ค่าการละลายโปรตีนของหมึกกระดองไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ขณะที่ค่าการละลายโปรตีนในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.6 โมลาร์ของหมึกกล้วยมีค่าลดลงสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของค่าฟอรั่มัลดีไฮด์ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเก็บรักษาหมึกกล้วยระยะเวลานานขึ้นมีผลทำให้โปรตีนเสียหายมากขึ้น ตลอดจนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางจุลภาคโดยเส้นใยกล้ามเนื้อของหมึกทั้งสองชนิดเริ่มคลายเครียดและเกิดช่องว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อหลังจาก 2 เดือนของการเก็บรักษา ค่าปริมาณน้ำอิสระ ปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อและการสูญเสียน้ำหนักหลังจากทำให้สุกเพิ่มสูงขึ้น ($p < 0.05$) ค่าแรงเฉือนของหมึกทั้งสองชนิดหลังจากการเก็บรักษามีค่าเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ค่า L^* ของหมึกทั้งสองชนิดลดลง ($p < 0.05$) ขณะที่ค่า a^* และ b^* มีค่าเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยไม่ขึ้นกับวิธีการแช่เยือกแข็ง คะแนนจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยวิธี QIM มีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่คุณภาพโดยรวมมีคะแนนลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ($p < 0.05$) โดยหมึกทั้งสองชนิดมีคะแนนระดับไม่ยอมรับหลังเก็บรักษา 3 เดือน อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่เก็บเป็นระยะเวลา 6 เดือนมีคะแนนไม่ถึงระดับปฏิเสธ การเปลี่ยนแปลงของค่าฟอรั่มัลดีไฮด์มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุดกับการทดสอบโดยการให้คะแนน QIM และคุณภาพโดยรวม ($p < 0.05$) ดังนั้น ค่าดังกล่าวจึงเป็นดัชนีที่เหมาะสมสำหรับเป็นดัชนีคุณภาพของหมึกทั้งสองชนิดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน ($\alpha = 0.01$)

Thesis Title Study on Quality Indices of Squid (*Photololigo duvaucelii*) and Cuttlefish (*Sepia aculeata*) during Iced and Frozen Storage.

Author Miss Adisara Tantasuttikul

Major program Food Technology

Academic Year 2009

ABSTRACT

Changes in the quality of squid (*Photololigo duvaucelii*) and cuttlefish (*Sepia aculeata*) during iced storage of 16 days were studied. Total volatile basic nitrogen (TVBN), ammonia and expressible drip were increased as storage time increased ($p<0.05$). Trimethylamine (TMA) was markedly increased after 10 and 8 days of storage in squid and cuttlefish, respectively. Both of total viable counts (TVC) and psychrophilic bacteria count increased as the storage time increased. However, those of both species were below 10^6 cfu/g of muscle after 16 days of storage. The lightness (L^*) values of both species were decreased during storage ($p<0.05$). However, the redness (a^*) values of both species were increased during storage ($p<0.05$), and that of squid was higher than that of cuttlefish. Increase in redness suggested staining of pigments on the mantle. The yellowness (b^*) values of squid was decreased, which that of cuttlefish was slightly increased ($p<0.05$). In addition, shear force of raw and cooked samples decreased as storage time increases ($p<0.05$). This was due to degradation of myosin heavy chain as shown by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and an increase in trichloroacetic acid (TCA)-soluble peptide content ($p<0.05$). Muscle deterioration was also revealed by scanning electron microscope (SEM), where the initial compact structure was loosened and the connective tissue disappeared during storage. Sensory evaluation revealed that quality index method (QIM) score increased, while overall quality decreased throughout the storage ($p<0.05$). According to overall quality score, shelf-life of both species were estimated to be 6 days. The changes in expressible drip were highly correlated with the sensory evaluation ($p<0.05$), that could be appropriate indicator of freshness of squid and cuttlefish stored in ice ($\alpha=0.01$).

Quality changes of squid and cuttlefish frozen under air-blast freezing and contact plate freezing during storage at -18°C were investigated for 6 months. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of squid and cuttlefish were increased throughout storage ($p<0.05$). During frozen storage, no significant differences of protein solubility of cuttlefish was observed ($p<0.05$). However, protein solubility in 0.6 M KCl of squid decreased in association with the increased formaldehyde (FA) content, indicating protein denaturation during extended storage ($p<0.05$). Microstructure showed that the muscle fibers of both species were loosened and the gaps were formed between muscle bundles after frozen storage for 2 months. Regardless of freezing method, free drip, expressible drip and cooking loss increased continuously with the increasing time of frozen storage ($p<0.05$). In addition, the increase in shear force of both samples was observed during storage ($p<0.05$). L^* values decreased, whereas a^* and b^* values decreased with the extended frozen storage ($p<0.05$). Sensory evaluation revealed that QIM score increased, while overall quality decreased throughout the storage. The overall quality score of both species was unacceptable after 3 months. The changes in FA were highly correlated with QIM and overall quality score ($p<0.05$), that could be appropriate indicators of quality of squid and cuttlefish during storage at -18°C for 6 months ($\alpha=0.01$).

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(8)
LIST OF TABLE.....	(11)
LIST OF FIGURE.....	(12)
บทที่	
1 บทนำ.....	1
บทนำตั้งเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
1. ลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของหมึก.....	2
2. องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อหมึก.....	5
3. การเปลี่ยนแปลงของหมึกระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง.....	10
4. ผลของการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งต่อคุณภาพของสัตว์ น้ำ.....	25
วัตถุประสงค์.....	29
2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ.....	30
วัสดุอุปกรณ์.....	30
วิธีการ.....	31
1. การศึกษาปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นดัชนีความสดของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่ เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง.....	31
2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนและโครงสร้างจุลภาคของเนื้อหมึกระหว่างการ เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง.....	34
3. การศึกษาปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นดัชนีความสดของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่ เก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง.....	34
4. การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	36
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	37
1. การศึกษาปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นดัชนีความสดของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่ เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง.....	37
1.1 การวิเคราะห์ทางด้านเคมี.....	37
	(8)

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
1.1.1 การเปลี่ยนแปลงของค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก.....	37
1.1.2 การเปลี่ยนแปลงของไตรเมทิลเอมีนไนโตรเจน ปริมาณของค่าที่ระเหยทั้งหมดและแอมโมเนีย.....	38
1.1.3 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช.....	41
1.2 การวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์.....	41
1.2.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ.....	41
1.3 การวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ.....	44
1.3.1 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ.....	44
1.3.2 การเปลี่ยนแปลงของค่าแรงเหวี่ยง.....	44
1.3.3 การเปลี่ยนแปลงค่าสี.....	45
1.4 การเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัส.....	47
1.4.1 การเปลี่ยนแปลงของ QIM.....	47
1.4.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพโดยรวม.....	50
1.4.3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างผลการทดลองทางด้านประสาทสัมผัส จุลินทรีย์ กายภาพและเคมีของหมึกกระดองและหมึกกล้วยที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง.....	51
2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนและโครงสร้างจุลภาคของเนื้อหมึกกระดองระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง.....	56
2.1 การวิเคราะห์ทางเคมี.....	56
2.1.1 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษา.....	56
2.1.2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจุลภาคในระหว่างการเก็บรักษา.....	57
2.2 การวิเคราะห์ทางกายภาพ.....	60
2.2.1 การเปลี่ยนแปลงแรงเหวี่ยง.....	60
2.3 การเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัส โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส.....	61
3. การศึกษาปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นดัชนีคุณภาพของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง.....	62

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.1 การวิเคราะห์ทางด้านเคมี.....	62
3.1.1 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช.....	62
3.1.2 การเปลี่ยนแปลงค่า Thiobabituric acid-reactive substance (TBARS).....	63
3.1.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์อิสระ.....	65
3.1.4 การเปลี่ยนแปลงการละลายของโปรตีน.....	67
3.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ.....	71
3.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจุลภาคในระหว่างการเก็บรักษา.....	71
3.2.2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระ (free drip) และปริมาณของเหลวที่ ออกจากกล้ามเนื้อ (expressible drip).....	75
3.2.3 การสูญเสียน้ำหนักหลังจากทำให้สุก (cooking loss).....	77
3.2.4 การเปลี่ยนแปลงแรงเนียน.....	79
3.2.5 การเปลี่ยนแปลงค่าสี.....	80
3.3 การเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัส.....	85
3.3.1 การเปลี่ยนแปลงของ QIM.....	85
3.3.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพโดยรวม.....	87
3.3.3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างผลการทดลองทางด้านประสาท สัมผัส จุลินทรีย์ กายภาพ และเคมีของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บ รักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส.....	89
4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	95
เอกสารอ้างอิง.....	97
ภาคผนวก.....	112
ประวัติผู้เขียน.....	142

LIST OF TABLES

Table	Page
1	Chemical composition of cuttlefish (<i>Sepia aculeate</i>) and squid (<i>Photololigo duvauceli</i>)..... 5
2	The sensory descriptors of appearance and smell of squid in ice storage..... 17
3	QIM scheme for whole raw octopus (<i>Octopus vulgaris</i>) in crushed ice..... 18
4	QIM scheme for whole raw cuttlefish (<i>Sepia officinalis</i>) in crushed ice..... 19
5	QIM scheme for whole raw squid (<i>Illex coindetii</i>) in crushed ice..... 20
6	EC scheme for cephalopods, applicable to cuttlefish..... 21
7	Modified EC scheme for octopus (<i>Octopus vulgaris</i>)..... 22
8	Attributes of cooked salmon samples assessed by the QDA method..... 23
9	Changes in L*, a* and b* of deskinned squid during iced storage..... 46
10	Changes in L*, a* and b* of deskinned cuttlefish during iced storage..... 47
11	Correlation coefficient between objective and subjective qualities of squid and cuttlefish during iced storage..... 53
12	Changes in protein solubility (%) of squid and cuttlefish muscle frozen by different freezing methods during storage at -18°C 70
13	Changes in L* values of deskinned squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C 82
14	Changes in a* values of deskinned squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C 83
15	Changes in b* values of deskinned squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C 84
16	Correlation coefficient between objective qualities and QIM score of squid and cuttlefish frozen by different methods during frozen storage..... 90

LIST OF FIGURE

Figure		Page
1	Structure of squid.....	3
2	Structure of cuttlefish.....	3
3	Physiology of cuttlefish: <i>Sepia aculeate</i> and squid: <i>Photololigo duvauceli</i>	4
4	Artist's rendition of squid mantle.....	4
5	Muscle pigment of cephalopod.....	8
6	An example of a cobweb or radar plot of QDA.....	24
7	The scale for Overall Quality.....	25
8	Factors that Affect, directly or indirectly, muscle protein denaturation and consequent loss of protein functionality during frozen storage.....	26
9	Changes in TCA-soluble peptides of deskinning squid and cuttlefish during iced storage.....	38
10	Changes in ammonia total volatile based nitrogen (TVB-N) and trimethylamine nitrogen (TMA-N) in deskinning squid and cuttlefish during iced storage.....	40
11	Changes in pH from squid and cuttlefish during iced storage.....	41
12	Changes in total viable count and psychrophilic bacteria counts from squid and cuttlefish during iced storage.....	43
13	Changes in expressible drip from deskinning squid and cuttlefish during iced storage.....	44
14	Change in shear force of deskinning squid and cuttlefish during iced storage.....	44
15	Changes in QIM score of squid during iced storage.....	49
16	Changes in QIM score of cuttlefish during iced storage.....	50
17	Changes in overall quality score of squid and cuttlefish during iced storage.....	51
18	Correlation regression between sensory analysis (overall quality and QIM) and expressible drip of squid.....	54
19	Correlation regression between sensory analysis (overall quality and QIM) and expressible drip of cuttlefish.....	55

LIST OF FIGURE

Figure		Page
20	Changes in SDS-PAGE patterns of squid muscle and cuttlefish muscle during iced storage.....	56
21	Scanning electron microscopic of transverse section of raw squid during iced storage.....	58
22	Scanning electron microscopic of transverse section of raw cuttlefish during iced storage.....	59
23	Changes in shear force of raw and cooked squid during iced storage	60
24	Changes in texture score of raw squid and cuttlefish during iced storage.....	61
25	Changes in pH squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	62
26	Changes in TBARS of squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	65
27	Changes in formaldehyde of squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	67
28	Scanning electron microscope of cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	73
29	Scanning electron microscope of squid frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	74
30	Changes in the free drip of deskinned squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	76
31	Changes in the expressible drip of deskinned squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	77
32	Changes in the cooking loss of deskinned squid and cuttlefish frozen using air-blast freezing and contact plate freezing during storage at -18°C	78

LIST OF FIGURE

Figure		Page
33	Changes in shear force of raw deskinning squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	80
34	Changes in QIM score of squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	86
35	Changes in overall quality score of squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C	88
36	Correlation regression between sensory analysis (overall quality and QIM) and formaldehyde content of squid frozen using air-blast freezing during storage at -18°C	91
37	Correlation regression between sensory analysis (overall quality and QIM) and formaldehyde content of squid frozen using contact plate freezing during storage at -18°C	92
38	Correlation regression between sensory analysis (overall quality and QIM) and formaldehyde content of cuttlefish frozen using air-blast freezing during storage at -18°C	93
39	Correlation regression between sensory analysis (overall quality and QIM) and formaldehyde content of squid frozen using contact plate freezing during storage at -18°C	94

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การส่งออกหมีกของประเทศไทยเป็นส่วนสำคัญในการสร้างรายได้กับประเทศ โดยมีการส่งออกไปญี่ปุ่นเป็นอันดับ 1 ในช่วงปี 2552 มีปริมาณ 18,361.81 ตัน มูลค่า 2,692.48 พันบาท ตลาดส่งออกที่สำคัญ คือ อิตาลี ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา จีนและสเปน (อำพร เลาวพงษ์, 2552) ความสดของหมีกมีความสำคัญมากต่อคุณภาพและการกำหนดมูลค่าของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความสดสูง เช่น ซาซิมิแซ่เยือกแข็ง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของญี่ปุ่นที่ผู้บริโภคนำไปบริโภคสด อุตสาหกรรมการแปรรูปหมีกมักประสบปัญหาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของหมีกที่รวดเร็วระหว่างการเก็บรักษา โดยหมีกจะเปลี่ยนจากสีเข้มเป็นสีจางภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากการตาย และในหมีกกระดองมักเกิดปฏิกิริยาของไขมันกับออกซิเจน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อหมีกกระดองเป็นสีเหลือง เนื่องจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่อาศัยเอนไซม์ ระหว่างไขมันที่เกิดการออกซิเดชันกับหมู่เอมีนในองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิด หรือหมู่เอมีนของโปรตีน (Thanonkaew *et al.*, 2008) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนส ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ปัจจุบันการตรวจสอบคุณภาพของหมีกที่นำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปในโรงงานอุตสาหกรรมยังไม่มีวิธีการที่สะดวกและถูกต้องแม่นยำแต่อาศัยความชำนาญเฉพาะบุคคล ทำให้ผลการตรวจสอบคุณภาพของหมีกไม่แน่นอน

จากการศึกษาข้อมูลการวิจัยเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจสอบคุณภาพหมีก พบว่าการศึกษาดัชนีความสดของหมีกในต่างประเทศ ได้แก่ หมีกกระดอง (*Sepia pharaonis*) หมีกสาย (*Octopus vulgaris*) และหมีกกล้วย (*Loligo plei*) ของประเทศสเปน โดยการใช้ดัชนีความสดที่มีผู้ศึกษามาแล้วจำกัดสำหรับการตรวจสอบคุณภาพหมีกเฉพาะบางสายพันธุ์เท่านั้น (Vaz-Pires and Seixas, 2006) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาข้อมูลดังกล่าว ดังนั้นเป้าหมายของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพหรือความสดของหมีกทั้งที่เก็บรักษาตามแบบที่โรงงานอุตสาหกรรมปฏิบัติ ได้แก่ การเก็บรักษาในน้ำแข็ง และแบบแช่เยือกแข็ง ในด้านเคมี ด้านจุลินทรีย์ และทางกายภาพ เพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยคุณภาพที่มีความใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัส ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่สำคัญที่สุดในการประเมินความสดของผลิตภัณฑ์ประมง (Vaz-Pires and Seixas, 2006) เพื่อสามารถตรวจสอบคุณภาพหรือความสดของหมีกได้

โดยสะดวก รวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำ ให้ได้วัตถุดิบที่มีคุณภาพในการนำไปแปรรูปเพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออกของอุตสาหกรรมอาหารทะเลของไทยต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของหมึก

หมึกเป็นสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังจัดอยู่ในไฟลัม mollusca คลาส Cephalopods และชั้นคลาส Coleodides มีทั้งหมด 3 ชนิด คือ หมึกกล้วย หมึกกระดองและหมึกสาย โครงสร้างพื้นฐานภายนอกของหมึกกล้วย โดยทั่วไปมีองค์ประกอบส่วนใหญ่ คือ ลำตัว (mantle) มีรูปร่างเป็นรูปกรวย และบริเวณส่วนท้ายมีครีบ (fin) ผิวหนังบริเวณหลังมีเม็ดสี (chromatophores) มากกว่าส่วนท้อง หมึกกล้วยมีหนวดทั้งหมด 5 คู่ โดยบนหนวดจะมีปุ่มที่เรียกว่า sucker หนวดบริเวณหลังมี 1 คู่ คือ หนวดคู่ที่ 1 ด้านซ้ายและขวา (left arm I and right arm I) ถัดมาเป็นหนวดที่อยู่ส่วนท้องเรียงตามลำดับ คือ หนวดคู่ที่ 2 (left-right arm II) คู่ที่ 3 (arm III) หนวดที่ยาวที่สุดเรียกว่า tentacle และหนวดคู่ที่ 4 (arm IV) บริเวณใต้หนวดคู่ที่ 4 จะมีช่องว่างที่เรียกว่า funnel (Figure 1) (Hanabe *et al.*, 1989) สายพันธุ์หมึกกล้วยที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *L. chinensis* และ *L. duvauceli* (กรมประมง, 2552) โดยสายพันธุ์ *Photololigo duvauceli* (หมึกกล้วยอินเดียหรือ Indian squid) เป็นหมึกที่พบมากและใช้เป็นวัตถุดิบส่วนใหญ่ในโรงงานอุตสาหกรรม ลักษณะโดยทั่วไป คือ รูปร่างยาวเรียว ลำ ตัวกลม ครีบเป็นสามเหลี่ยมอยู่ด้านหลัง ลำตัวมีกระดองใสเหมือนแผ่นพลาสติก วงแหวนของปุ่มดูดอันใหญ่บนมือ มีพื้นรูปกรวยแหลม ยาวอยู่รอบวง 14-17 ซึ่งไม่มีพื้นเล็กสลับวงแหวนของปุ่มดูดบนแขนคู่ที่ 3 เป็นพื้นตัดซี่ใหญ่ (Figure 3 (right)) (สถาบันอาหาร, 2543; กรมประมง, 2550) โครงสร้างพื้นฐานภายนอกของหมึกกระดอง โดยทั่วไป คือ หนวดสั้นทั้งหมด 8 เส้น และมีหนวดยาวที่สุดเรียกว่า tentacle ซึ่งหมึกกระดองจะใช้ tentacle ในการจับเหยื่อ ลำตัวจะป้อมสั้นกว่าหมึกกล้วย (Figure 2) (Ross, 2005) สายพันธุ์หมึกกระดองที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Sepioteuthis lessoniana*, *Sepia brevimana*, *S. recurvirosta*, *S. pharaonis*, *Sepiella inermis* และ *Sepia aculeata* (กรมประมง, 2552) โดยหมึกกระดอง *Sepia aculeata* (Needle cuttlefish) เป็นหมึกที่พบมากและใช้เป็นวัตถุดิบส่วนใหญ่ในโรงงานอุตสาหกรรม ลักษณะโดยทั่วไป คือ มีรูปร่างเรียวยาว ปุ่มดูดมีขนาดเล็กเกือบเท่าๆ กันในเพศผู้มี 10 – 12 ปุ่ม ตามแนวขวาง เพศเมียมี 13 – 14 ปุ่ม กระดองแข็งรูปไข่ ไม่มีร่องตรงกลาง ขอบในทางส่วนท้ายของกระดอง เป็นรูปแคบโค้งมน เพศผู้แขนสำหรับผสมพันธุ์คู่ที่ 4 ข้างซ้าย ปุ่มดูดแถวที่ 4 – 10 นับจากโคนแขน ขึ้นมามีขนาดเล็ก ด้านบนใกล้ๆ ขอบแขนเป็นหลุมกลม สีด้านหลังของลำตัวมีสีเทาดำ

เพศผู้มีมีลายเป็นทางสีจางพาดขวางลำตัว ความยาวตัวสูงสุด 23 เซนติเมตร (Figure 3 (left)) พบแพร่กระจายในอ่าวไทย มหาสมุทรอินเดีย และแปซิฟิกตั้งแต่ตอนใต้ของอินเดียถึงทะเลจีนใต้ และทะเลจีนตะวันออก ตลอดเหนือถึงใต้ของญี่ปุ่น (สถานีประมงทะเลจังหวัดสตูล, 2553)

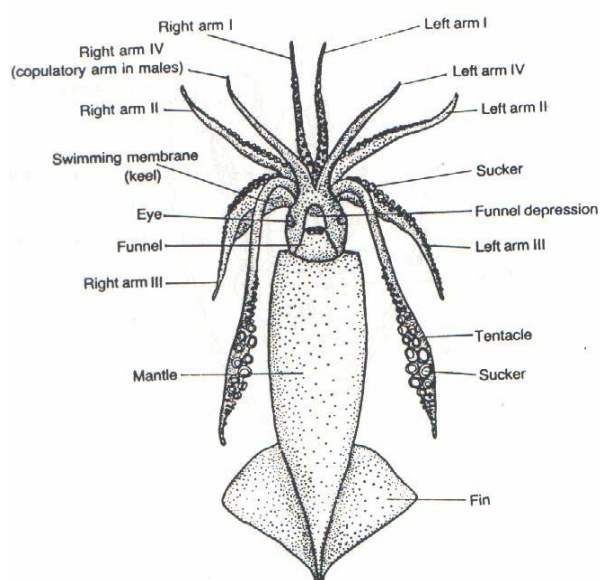


Figure 1. Structure of squid

ที่มา: Hanabe และคณะ (1989)

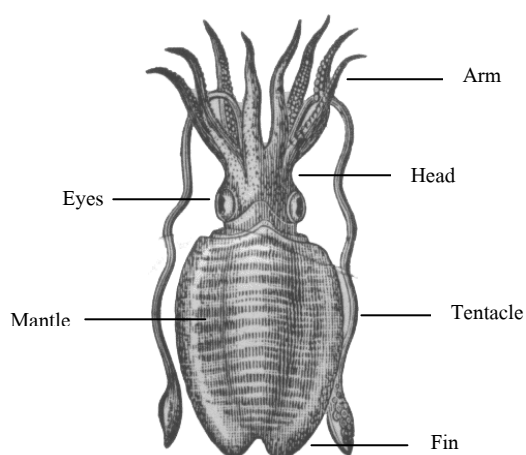


Figure 2. Structure of cuttlefish

ที่มา: Wikipedia (2004)

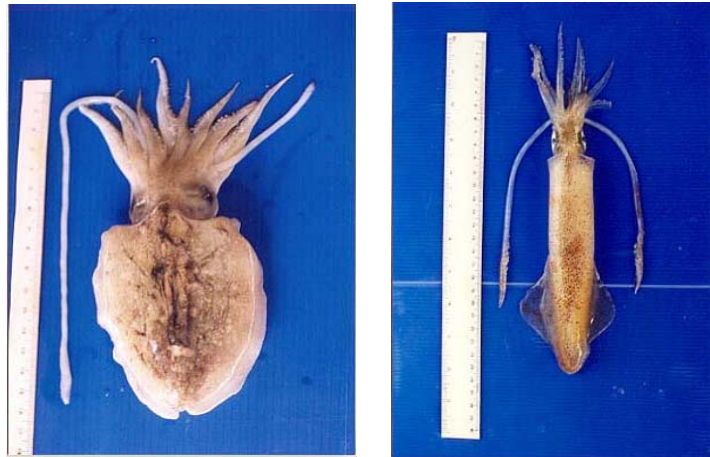


Figure 3. Physiology of cuttlefish: *Sepia aculeate* (life) and squid: *Photololigo duvauceli* (right)
ที่มา: กรมประมง (2552)

เนื้อส่วนลำตัวของหมึกประกอบด้วยชั้นเนื้อเยื่อจำนวน 5 ชั้น ชั้นกลางเป็นชั้นที่มีความหนาที่สุด (ประมาณร้อยละ 98 ของความหนาทั้งหมด) โดยประกอบด้วยแผ่นของเส้นใยกล้ามเนื้อหลายแผ่นเรียงซ้อนกัน เส้นใยกล้ามเนื้อประกอบด้วยไมโอไฟบริลจำนวนมาก บริเวณตรงกลางของเส้นใยกล้ามเนื้อ ประกอบด้วย ชาร์โคพลาสซึม ไมโทคอนเดรีย และนิวคลีไอ ปกติเส้นใยกล้ามเนื้อมีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 3.5 ไมครอน ชั้นของเส้นใยกล้ามเนื้ออยู่ระหว่างชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน 2 ชั้น คือ outer tunic และ inner tunic ส่วนของ outer tunic ประกอบด้วยเส้นใยของคอลลาเจนจะอยู่ติดกับ outer lining ซึ่งมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นองค์ประกอบ และอยู่ติดกับผิวหนัง สำหรับ inner tunic ซึ่งมีการจับตัวของเส้นใยหลวมๆ จะถูกปกคลุมด้วย visceral lining (Figure 4) (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

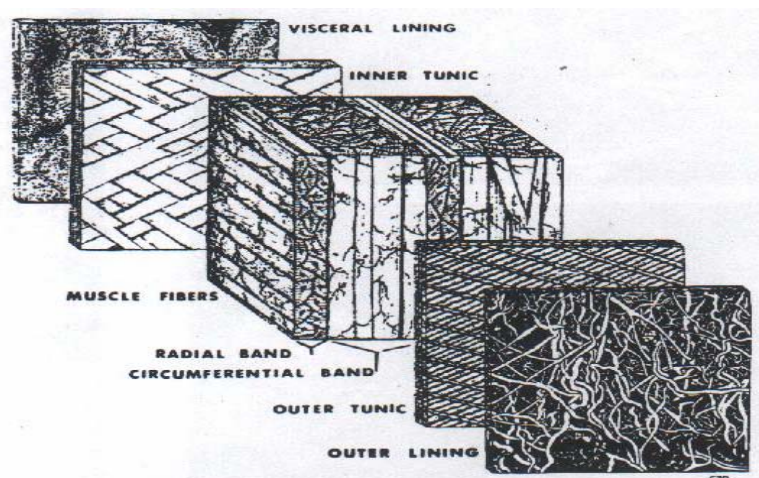


Figure 4. Artist's rendition of squid mantle.

ที่มา: Otwell และ Hamann (1979)

2. องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อหมึก

องค์ประกอบหลักทางเคมีของหมึกประกอบด้วย น้ำ โปรตีน และไขมัน โดยองค์ประกอบดังกล่าวมีประมาณร้อยละ 98 ของน้ำหนักเนื้อทั้งหมด ดัง Table 1 องค์ประกอบเหล่านี้มีผลต่อ สมบัติเชิงหน้าที่ คุณภาพด้านประสาทสัมผัสและอายุเก็บรักษา สำหรับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และเกลือแร่มีปริมาณน้อยมีความสำคัญต่อกลิ่นรสมากกว่าคุณค่าทางโภชนาการ (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2548)

ความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีจะขึ้นอยู่กับเพศ ขนาดและฤดูกาล โดยในช่วงเดือนเมษายน (ก่อนฤดูวางไข่) จะมีองค์ประกอบของน้ำในกล้ามเนื้อน้อยกว่าแต่มีปริมาณโปรตีนมากกว่าหมึกในช่วงเดือนมิถุนายน (หลังฤดูวางไข่) (Hanabe *et al.*, 1989)

Table 1. Chemical composition of cuttlefish (*Sepia aculeate*) and squid (*Photololigo duvauceli*)

Cephalopods	Wet basis (%)				
	Moisture content	Protein	Fat	Fiber	Ash
Squid	75.96	20.21	0.69	0.36	1.44
Cuttlefish	78.10	18.81	0.84	0.37	1.36

ที่มา: กรมประมง (2552)

2.1 น้ำ

กล้ามเนื้อของหมึกประกอบด้วยน้ำร้อยละ 75-80 น้ำมีบทบาทสำคัญในการละลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์สำหรับปฏิกิริยาทางชีวเคมี และมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาต่างๆ ซึ่งการจับน้ำของโปรตีน (hydration) มีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสและความฉ่ำน้ำของเนื้อ (juiciness) (Hanabe *et al.*, 1989)

2.2 โปรตีน

ปริมาณโปรตีนในกล้ามเนื้อหมึกแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกันไป โดยกล้ามเนื้อของหมึกกล้วยสายพันธุ์ *Illex coindetii* และสายพันธุ์ *Photololigo duvauceli* ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 18-20 และ 20.21 ตามลำดับ หมึกกระดองสายพันธุ์ *Sepia pharaonis* และ *Sepia aculeate* ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 14.91 และ 18.81 ตามลำดับและหมึกสายสายพันธุ์ *Octopus vulgaris* ประกอบด้วยโปรตีน ร้อยละ 16 (Vaz-Pires and Barbosa, 2004; Vaz-Pires and Barbosa, 2006; Thanonkaew *et al.*, 2006a; กรมประมง, 2552) โดยโปรตีนแต่ละชนิดจะมีหน้าที่แตกต่างกัน

ไป ปริมาณและสัดส่วนของโปรตีนแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันขึ้นกับอายุ เพศ และการเคลื่อนไหวของร่างกายของหมึก (Okuzumi and Fujii, 2000) โดยทั่วไปสามารถจำแนกโปรตีนที่สำคัญในสัตว์น้ำได้ 3 ประเภท คือ

2.2.1 โปรตีนไมโอไฟบริล (myofibrillar proteins)

โปรตีนไมโอไฟบริลมีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ และมีบทบาทต่อการยึดหดของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้มีความสำคัญต่อการอุ้มน้ำของเนื้อ และความสามารถในการเกิดเจล (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548) โปรตีนไมโอไฟบริลสามารถสกัดได้ด้วยสารละลายเกลือที่มีค่าความแรงไอออนมากกว่า 0.15 แต่ไม่ละลายในน้ำ โดยทั่วไปเนื้อสัตว์น้ำประกอบด้วยโปรตีนไมโอไฟบริลอยู่ร้อยละ 40-60 ของโปรตีนทั้งหมด หมึกกล้วยจะมีโปรตีนไมโอไฟบริลเป็นส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 77-85 ซึ่งมากกว่าสัตว์น้ำชนิดอื่น (Okuzumi and Fujii, 2000) ส่วนหมึกกระดองจะมีโปรตีนไมโอไฟบริลเป็นส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 58 (Thanonkaew *et al.*, 2006a) โปรตีนไมโอไฟบริลประกอบด้วย

2.2.1.1 ฟิลาเมนต์เส้นหนา (thick filament)

ฟิลาเมนต์เส้นหนาในหมึกประกอบด้วยโปรตีนแกนที่เรียกว่า พาราไมโอซิน และล้อมรอบด้วยไมโอซินที่มีโครงสร้างเป็นเกลียว ทำให้ฟิลาเมนต์มีความยาวและหนามากกว่าสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และเป็นโครงสร้างที่เป็นลักษณะเฉพาะของหมึก (Okuzumi and Fujii, 2000) ฟิลาเมนต์เส้นหนา (thick filament) ประกอบด้วยไมโอซินเป็นองค์ประกอบสำคัญปริมาณร้อยละ 45 และพาราไมโอซินซึ่งเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีประมาณร้อยละ 14 ของโปรตีนไมโอไฟบริล โปรตีนไมโอซินมีส่วนในการควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อของสัตว์จำพวกมอลลัส และ มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

2.2.1.2 ฟิลาเมนต์เส้นบาง (thin filament)

ฟิลาเมนต์เส้นบาง (thin filament) หรือ แอกติน (actin) มีปริมาณร้อยละ 20 ของโปรตีนไมโอไฟบริล มีรูปร่างคล้ายเม็ดถั่ว 2 เม็ดที่มีขนาดเท่ากันเรียงต่อกัน โมโนเมอร์ของแอกตินเรียกว่า globular actin หรือ จี-แอกติน (G-actin) เมื่อจี-แอกตินเรียงต่อกันตามยาวเป็นโครงสร้างแบบ double-helical structure เรียกว่า fibrous actin หรือ เอฟ-แอกติน (F-actin) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,200-48,000 ดาลตัน ฟิลาเมนต์ของเอฟ-แอกติน สามารถมีอันตรกิริยากับส่วนหัวของไมโอซิน (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

2.2.2 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic proteins)

หมึกกล้วยมีโปรตีนซาร์โคพลาสมิกปริมาณร้อยละ 12-20 ของโปรตีนทั้งหมด โปรตีนดังกล่าวละลายน้ำหรือสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 50 มิลลิโมลาร์) โปรตีนชนิดนี้ (Kijowski, 2001) ได้แก่

2.2.2.1 เอนไซม์ เอนไซม์สำคัญที่มีผลกับคุณภาพสัตว์น้ำ คือ ไฮโดรเลส (hydrolase) ออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductase) และทรานส์เฟอเรส (transferase) (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548) โดยไฮโดรเลส (hydrolase) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายของสัตว์น้ำ เช่น เอนไซม์โปรติเนส เพปติเคส ไลเพส ฟอสโฟไลเพสและไกลโคเจนไฮโดรเลส Dublan-Garcia และคณะ (2005) พบว่า เอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อหมึกกล้วย (Giant squid, *Dosidicus gigas*) มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอชในช่วงกรด 2.7-3.1 และพีเอชในช่วงด่าง 6.1-7.6 เอนไซม์เหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มของซีรีน ซีสเทอีน และเมททิลโลโปรติเนส มีบทบาททำให้หมึกกล้วยมีคุณภาพลดลง ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยอัตราการย่อยสลายจะขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์ของหมึก ขนาด ระยะการเจริญเติบโต อาหาร วิธีการจับ และอุณหภูมิการเก็บรักษา ส่งผลให้เกิดการย่อยของโปรตีนไมโอซินเส้นหนัก ปรากฏจากการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัส มีผลทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนและการเกิดเจลลดลง Ebina และคณะ (1995) พบว่า Trypsin-like proteinase ของหมึกกล้วย (spear squid) มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเป็นกลาง และมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ เอนไซม์ดังกล่าวมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายไมโอซินเส้นหนัก และส่งผลต่อเนื้อสัมผัสของเจลที่เหนียวนำด้วยความร้อนมีค่าลดลง An และคณะ (1998) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสของหมึกกล้วย ส่วนใหญ่จะทำงานในช่วงพีเอชเป็นกรด ที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส เอนไซม์โปรติเนสจากหมึกกล้วยมีกิจกรรมแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ดังนี้ *Illex illecebrosus* จะมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 2.6 และสำหรับ *Loligo pealei* มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 3.6 จะมีกิจกรรมต่ำสุดที่พีเอชเป็นด่าง โดยเอนไซม์โปรติเนสที่มีบทบาทในหมึกกล้วยดังกล่าว คือ Cathepsin D และ E (Leblanc and Gill, 1982 อ้างโดย An *et al.*, 1998) ส่วนในหมึกสาย (*Octopus vulgaris*) มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 2.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (An *et al.*, 1998)

2.2.2.2 โปรตีนเม็ดสี โดยทั่วไปจะไม่พบฮีโมโกลบินในสัตว์จำพวกครัสเตเชีย และมอลลัส แต่จะพบโปรตีนที่ประกอบด้วยทองแดงเรียกว่า ฮีโมไซยานิน เป็นรงควัตถุหลักซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงและก่อให้เกิดปัญหาด้านสีของผลิตภัณฑ์ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

หมึกมีถุงเม็ดสี (chromatophores) กระจายอยู่ทั่วไปบนผิวชั้นนอกของอพิเดอร์มิส (epidermis) ในแต่ละถุงเม็ดสีจะประกอบด้วย ถุงเม็ดสีเดี่ยวๆ หลายถุงอยู่ภายใน โดยเม็ดสีจะบรรจุอยู่ในถุง (sac) ที่มีความยืดหยุ่น ที่เรียกว่า cytoelastic sacculus เม็ดสีในหมึกจะประกอบด้วยสีต่างๆ ได้แก่ สีน้ำตาล สีดำ สีม่วง สีเหลือง สีน้ำเงิน สีส้ม และสีแดง ในการเปลี่ยนสีของหมึกเกิดจากการยืดและหดตัวของถุงเม็ดสีในหมึก การยืดและหดตัวของถุงเม็ดสีเกิดจากการควบคุมของระบบประสาท เมื่อเซลล์ประสาทถูกกระตุ้นจะทำให้เม็ดสีหดตัว ทำให้สีของหมึกเปลี่ยนแปลง (Richard *et al.*, 2003)

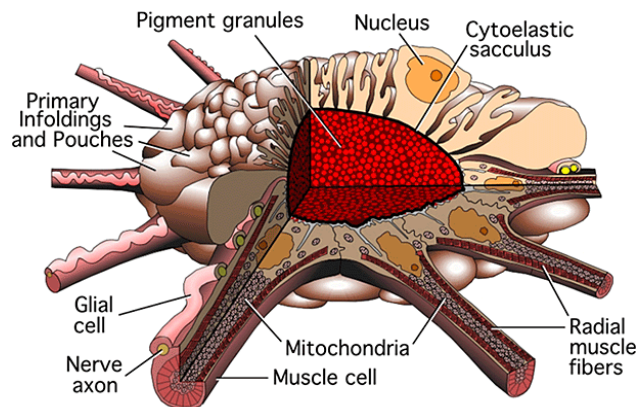


Figure 5. Muscle pigment of cephalopod

ที่มา: Richard และคณะ (2003)

ชนิดของเม็ดสี (pigment) ของหมึกกด้วยประกอบด้วย (Hanabe *et al.*, 1989)

1. โอมโมโครม (Ommochrome)

โอมโมโครม ประกอบด้วยสีเหลือง สีส้ม และสีม่วง อยู่บนผิวส่วนลำตัวบน หมวด หัว ครีบของหมึกและโดยเฉพาะส่วนหลังของลำตัว ทริพโตเฟนเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของโอมโมโครม สามารถแบ่งออกเป็น โอมมาติน (ommatin) ซึ่งมีโมเลกุลเล็ก และมีความเป็นด่างต่ำ ส่วนโอมมินจะมีโมเลกุลใหญ่และมีความเป็นด่างสูง

2. พีทีรีน (Pterin)

พีทีรีนอยู่บนชั้นของอพิเดอร์มิส และจะพบอยู่ในรูปแซนโทพีทีรีน (xanthopterin) และลิวโคพีทีรีน (leucopterin)

3. ลูมินัส ซับสแตนซ์ (Luminous substance)

ลูมินัสซับสแตนซ์ปรากฏอยู่บนผิวของลำตัวของหมึกจะมีลักษณะเป็นสีเงินวาวส่วนมากจะพบอยู่ในส่วนของคืบ และจะถูกส่งผ่านทางเลือดไปยังส่วนต่างๆ หมึกบางชนิดที่มีปริมาณของลูมินัสซับสแตนซ์สูงจะ เรียกว่า luminous squid

2.2.3 สโตรมา (stroma)

สโตรมาเป็นส่วนที่เหลือจากการสกัดโปรตีนซาร์โคพลาสซึมและโปรตีนไมโอไฟบริล สโตรมา ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น คอลลาเจน (collagen) และอีลาสติน (elastin) ปริมาณของคอลลาเจนในสัตว์น้ำขึ้นอยู่กับชนิด ระยะการเจริญเติบโต ความสมบูรณ์ของอาหาร โดยทั่วไปอัตราส่วนของคอลลาเจนต่ออีลาสตินในเนื้อปลาประมาณ 4 ต่อ 1 แต่ไม่พบข้อมูลในหมึก ปริมาณคอลลาเจนที่มีในหมึกกล้วยมีปริมาณร้อยละ 2-3 ส่วนหมึกสายมีปริมาณร้อยละ 7 จึงทำให้หมึกสายมีเนื้อสัมผัสที่เหนียวกว่าหมึกกล้วย กล้ามเนื้อหมึกในส่วนลำตัวและหนวดจะประกอบด้วยคอลลาเจนปริมาณร้อยละ 2-11 และ 2-16 ของโปรตีนตามลำดับ ส่วนหนังของหมึกกล้วยจะมีคอลลาเจนมากกว่าส่วนเนื้อประมาณ 2 เท่า (Okuzumi and Fujii, 2000) และการศึกษาของ Morales และคณะ (2000) พบว่าคอลลาเจนจาก cephalopods บางชนิด (volador: *Illex coindetii*; pota: *Toradopsis eblanae* และ octopus: *Eledone cirrhosa*) จะมีปริมาณคอลลาเจนในหนวด (arm) มากกว่าในส่วนลำตัว (mantle) ซึ่งคอลลาเจนที่พบเป็นคอลลาเจนชนิด I และ V โดยปริมาณของคอลลาเจนชนิด I จะมีปริมาณมากกว่าคอลลาเจนชนิด V ในอัตราส่วน 8 ต่อ 1

2.3 สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-proteinaceous compound)

สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนมีประมาณร้อยละ 37 ของเนื้อหมึก มีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพสัตว์น้ำในด้านกลิ่นรสและรสชาติ รวมทั้งมีผลต่อการเสื่อมเสียของสัตว์น้ำ ในกล้ามเนื้อของหมึกประกอบด้วย ไกลซีน อะลานีน บีเทนนิวคลีโอไทด์ และไตรเมทิลามีนออกไซด์ (TMAO) และผลผลิตที่ได้จากเมตาบอลิซึม เช่น เอมีน กรดอะมิโนอิสระ ออกโทป็นประมาณ 450-1150 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ส่วนอาร์จินีนมีประมาณ 600 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Sikorski and Kolodziejska, 1986) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และแอมโมเนียในเนื้อหมึกจะแตกต่างกันไป โดยหมึกกล้วย Boreal clubhook มีปริมาณแอมโมเนียเพียงเล็กน้อย (57 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมเนื้อ) ขณะที่ในหมึกกล้วย Giant squid มีมากถึง 600 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมเนื้อ (Okuzumi and Fujii, 2000)

2.4 ไขมัน

เนื้อหมึกกล้วยประกอบด้วยไขมันค่อนข้างต่ำ โดยมีไขมันร้อยละ 1-2 ส่วนมากพบในรูปฟอสโฟลิปิด ประมาณร้อยละ 62-84 มีไตรกลีเซอไรด์ปริมาณต่ำประมาณร้อยละ 0.8-3.2 มีสเตอรอลประมาณร้อยละ 15-20 และมีกรดไขมันอิสระประมาณร้อยละ 22 (Okuzumi and Fujii, 2000) หมึกกระดองสายพันธุ์ *Sepia aculeate* มีไขมันร้อยละ 0.84 (กรมประมง, 2550) และขณะที่สายพันธุ์ *Sepia pharaonis* มีปริมาณไขมันร้อยละ 1.2-1.3 ไขมันที่พบจากส่วนหัวและส่วนลำตัวจะประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดเป็นส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 78.6-87.8 ไคลิเซอไรด์ร้อยละ 10.6-19.5

ส่วนประกอบของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวส่วนใหญ่จะเป็น Docosahexaenoic acid (DHA) และ Eicosapentaenoic acid (EPA) ร้อยละ 50.3-54.9 ของกรดไขมันทั้งหมด (Thanonkaew *et al.*, 2006a)

3. การเปลี่ยนแปลงของหมึกระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง

3.1 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

ภายหลังการตายของสัตว์จำพวก cephalopods โปรตีนจะเกิดการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเอนไซม์ภายในลำตัวของหมึกที่มีกิจกรรมสูง ส่งผลให้เกิดสารประกอบไนโตรเจนที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนกล้ามเนื้อ ซึ่งส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้สามารถย่อยสลายโปรตีนได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยในหมึกสายเอนไซม์โปรตีนเอนไซม์บทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ และมีกิจกรรมสูงกว่าในปลาชนิดอื่นๆ (Hurtado *et al.*, 1999 อ้างโดย Vaz-Pires and Barbosa, 2004) จากการศึกษาของ Dublan-Garcia และคณะ (2005) ในการเก็บรักษาหมึกกล้วย giant squid ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า โปรตีนกล้ามเนื้อหมึกเกิดการย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในกล้ามเนื้อหรือและเอนไซม์โปรตีนเอนไซม์จากจุลินทรีย์ จากการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงให้เห็นการย่อยสลายของไมโอซินเส้นหนัก และไม่พบแถบของโปรตีนดังกล่าวภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 วัน รวมทั้งการลดลงของแถบโปรตีนแอกติน ขณะที่พาราไมโอซิน และแถบโปรตีนอื่นๆ ไม่เปลี่ยนแปลงตลอดการเก็บรักษา 9 วัน นอกจากนี้ผลการตรวจสอบโครงสร้างจุลภาคโดยอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) แสดงให้เห็นว่า การย่อยสลายโปรตีนโดยกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวมีผลให้โครงสร้างของกล้ามเนื้อเกิดช่องว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อและเส้นใยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดเป็นบริเวณอสัณฐาน (amorphous area) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้กล้ามเนื้อหมึกมีเนื้อสัมผัสนุ่มลง โดยมีค่าต้านแรงเฉือนลดลงจาก 16.5 นิวตัน ไปเป็น 7.0 นิวตัน ภายหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 8 วัน และส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลที่เตรียมจากเนื้อหมึกกล้วยที่เก็บรักษามีค่าลดลงเช่นเดียวกัน

Ando และคณะ (1999) พบว่า กล้ามเนื้อหมึกกล้วย (arrow squid) มีค่าแรงเฉือนลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังการตายที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ส่งผลให้กล้ามเนื้อหมึกกล้วยมีเนื้อสัมผัสนุ่มลงโดยโครงสร้างทางจุลภาคจากการใช้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) แสดงให้เห็นรูเล็กๆ (pore) ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อของเนื้อหมึกกล้วยและโครงสร้างทางจุลภาคจากการใช้อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopic) แสดงให้เห็นช่องว่างที่เกิดจากการแยกเซลล์กล้ามเนื้อออกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายของโปรตีน และพบว่าความสดมีผลต่อความแน่นเนื้อ (firmness) และโครงสร้างของกล้ามเนื้อหมึกสด แต่ไม่มีผลต่อหมึกที่ผ่านการให้ความร้อน นอกจากนี้การศึกษาของ Kagawa และคณะ (2002) พบว่าการย่อยสลาย

กล้ามเนื้อของหมึกกล้วย oval squid, arrow squid และ Japanese common squid ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 580 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าเป็นแถบของโปรตีนเนบูลิน (nebulin) มีความเข้มข้นสูงและมีความสัมพันธ์ทางตรงกับความแน่นเนื้อ (firmness) และค่าแรงยึดติด (adhesiveness) ขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของคอลลาเจนทั้งหมดและคอลลาเจนที่ละลายในน้ำ ตลอดการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

3.2 การเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน

ในระหว่างการเน่าเสียของสัตว์น้ำโดยจุลินทรีย์จะเกิดสารระเหยได้หลายชนิด เช่น แอมโมเนีย ไดเมทิลเอมีน (dimethylamine, DMA) และไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้ สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพของสัตว์น้ำได้โดยแสดงในรูปปริมาณของค่าที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile based nitrogen, TVBN) (Okuzumi and Fujii, 2000) จากการศึกษาของ Lapa-Guimaraes และคณะ (2005) พบว่าช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษาหมึกกล้วย (*Loligo plei*) โดยการแช่แข็งมีการเปลี่ยนแปลงของค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดเพียงเล็กน้อย แต่หลังจาก 12 วันของการเก็บรักษาจะมีปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนสจากจุลินทรีย์ ดังนั้นค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดจึงเป็นดัชนีบ่งบอกการเน่าเสียของสัตว์น้ำได้

อย่างไรก็ตามค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดไม่สามารถใช้บ่งบอกการเสื่อมเสียคุณภาพสัตว์น้ำในระยะเริ่มต้น เนื่องจากมักพบปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดอย่างเด่นชัดในช่วงที่เกิดการเน่าเสีย (Lapa-Guimaraes *et al.*, 2005) ค่าที่ระเหยที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษาสัตว์น้ำในสภาวะที่ไม่ใช่สภาวะแช่เยือกแข็งนั้นประกอบด้วยแอมโมเนีย และ TMA เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงสามารถใช้ปริมาณ TMA และแอมโมเนียเป็นตัวกำหนดคุณภาพสัตว์น้ำได้ อย่างไรก็ตามต้องพิจารณาถึงชนิดของสัตว์น้ำ เนื่องจากสัตว์น้ำบางชนิด โดยเฉพาะสัตว์น้ำจืดอาจตรวจ TMA ไม่พบในระหว่างการเน่าเสีย นอกจากนี้อาจจะต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ เช่น ระยะเวลาการเสื่อมเสีย แหล่งที่จับสัตว์น้ำ ช่วงระยะเวลาที่จับ ชนิดของการแปรรูปสัตว์น้ำ หรือรูปแบบของการเก็บรักษา นอกจากนี้ TMA ไม่สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพของสัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง เนื่องจากไดเมทิลเอมีน (DMA) และฟอสฟอรัสไฮดรอกไซด์ (FA) เป็นสารที่เกิดขึ้นระหว่างการแช่เยือกแข็ง ดังนั้นจึงใช้ TMA เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพก่อนการแช่เยือกแข็ง โดย TMA เกิดจากการเปลี่ยนไตรเมทิลเอมีน ออกไซม์ (trimethylamine oxide, TMAO) ด้วยเอนไซม์ไตรเมทิลรีดักเตสที่พบในจุลินทรีย์ (สุทรวัดน์ เบญจกุล, 2548) TMA ที่ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่หักลิ้นคาวของสัตว์น้ำ และมีระดับความ

เข้มข้นที่สามารถรับกลิ่นได้ต่ำมาก โดยมีค่าเท่ากับ 600 ppb (Regenstein *et al.*, 1982 อ้างโดย สุทรวัดน์ เบญจกุล, 2548)

ส่วนแอมโมเนียเป็นดัชนีที่บ่งบอกการเสื่อมเสียที่ดีในสัตว์น้ำจำพวกปลากระดูกอ่อน ครัสเตเชีย และหมีก แต่ไม่เหมาะกับการบ่งบอกคุณภาพของปลากระดูกแข็ง (Okuzumi and Fujii, 2000; สุทรวัดน์ เบญจกุล, 2548) โดยแอมโมเนียของสัตว์น้ำเกิดจากการสลายตัวหรือกระบวนการเอากลุ่มเอมีน (deamination) ของโปรตีน เพปไทด์ และกรดอะมิโนออก และอาจเกิดจากการสลายตัวของอะดีโนซีน โมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate, AMP) (Okuzumi and Fujii, 2000)

Lapa-Guimaraes และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลทางเคมีและจุลินทรีย์ในหมีกกล้วย (*Loligo plei*) ในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง โดยเปรียบเทียบความสดในการเก็บรักษาแบบสัมผัสน้ำแข็งโดยตรง และไม่สัมผัสน้ำแข็งโดยตรง พบว่าในตัวอย่างหมีกกล้วยที่เก็บรักษาแบบไม่สัมผัสน้ำแข็งโดยตรงจะมีค่าโปรตีนที่ไม่ใช่ไนโตรเจน และ Free amino acid nitrogen (FAA-N) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลอดการเก็บรักษา 17 วัน และการเพิ่มขึ้นของ FAA-N มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียที่ทนเย็น (psychotropic bacteria count) ส่วนการเก็บรักษาแบบสัมผัสน้ำแข็งโดยตรงจะมีค่าโปรตีนที่ไม่ใช่ไนโตรเจน และ Free amino acid nitrogen ลดลง เนื่องจากการสูญเสียไปกับส่วนของน้ำแข็งที่ละลาย และยังพบว่าค่าค่าที่ระเหยได้ (Volatile basic nitrogen, VBN) และค่าไตรเมทิลเอมีนไนโตรเจน (Trimethylamine nitrogen, TMA-N) มีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วงวันแรกๆ ของการเก็บรักษา และมีค่าสูงขึ้นหลังจากวันที่ 12 โดยหมีกกล้วยที่ถูกเก็บรักษาแบบไม่สัมผัสน้ำแข็งโดยตรงมีค่าสูงกว่าหมีกกล้วยที่ถูกเก็บรักษาแบบสัมผัสน้ำแข็งโดยตรง เนื่องจากการชะไปกับน้ำแข็งที่ละลายตั้งที่กล่าวมาแล้ว ส่วนค่าทริปโตเฟนอิสระ (free tryptophane) และค่ายูเรีย (urea) ของหมีกที่เก็บรักษาแบบไม่สัมผัสน้ำแข็งจะมีค่าสูงขึ้นอย่างชัดเจนตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แต่การเก็บรักษาแบบสัมผัสน้ำแข็งโดยตรงค่าดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เนื่องจากจะสูญเสียสารดังกล่าวไปกับส่วนของน้ำแข็งที่ละลายเช่นกัน ดังนั้นค่าทริปโตเฟนอิสระและยูเรียสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดความสดของหมีกกล้วย (*Loligo plei*) ที่เก็บในสภาวะดังกล่าวได้

3.3 ฟิเซ

ฟิเซของสัตว์น้ำสามารถวัดได้โดยการใช้ฟิเซมิเตอร์ ซึ่งสามารถวัดได้โดยตรงในเนื้อสัตว์ หรือการวัดฟิเซจากสารแขวนลอยของเนื้อสัตว์น้ำในน้ำกลั่น (สุทรวัดน์ เบญจกุล, 2548) ฟิเซของสัตว์น้ำจะแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์น้ำ และตามฤดูกาล เช่น ปลาน้ำจืดจะมีฟิเซอยู่ในช่วง 6.9-7.3 ปลาที่อาศัยในเขตนํ้าร้อนฟิเซ อยู่ในช่วง 6.4-6.8 ปลาทะเลจะมีฟิเซอยู่

ในช่วง 6.1-7.0 (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2548) ส่วนฟิโชนในกุ้งแช่เยือกแข็งพบว่า ฟิโชนเพิ่มจาก 7.19 เป็น 7.71 ใน 1 วัน และเพิ่มเป็น 8.05 ในวันที่ 5 (นงลักษณ์ สุทธิวิช, 2531 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2548) และหมึกกล้วยมีฟิโชนเริ่มต้นเท่ากับ 6.8 และเมื่อเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 วัน ฟิโชนเพิ่มขึ้นเป็น 7.5 (Paarup *et al.*, 2002) การเพิ่มขึ้นของฟิโชนในช่วงการเก็บรักษาอาจจะเป็นผลมาจากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีนสและการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดขึ้น (Huss, 1999 อ้างโดย Dublan-Garcia *et al.*, 2005)

3.4 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์

ในช่วงที่สัตว์น้ำตายใหม่ๆ โดยเฉพาะในช่วงเกร็งตัว (rigor mortis) มีการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียอย่างมากซึ่งเปรียบเสมือนช่วง lag phase ซึ่งในระยะนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรสและลักษณะบางประการ ต่อจากนั้นแบคทีเรียจะเข้าสู่ระยะ log phase ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการเสื่อมเสีย ในช่วงนี้จะพบ TMA และค่างชนิดอื่นๆ ส่วนในระยะ stationary phase มีปริมาณจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ ถึงแม้ว่าปริมาณแบคทีเรียไม่ได้เพิ่มขึ้นแต่เป็นระยะที่มีกลิ่นเหม็นเน่า (putridity) จุลินทรีย์พวกที่ก่อให้เกิดกลิ่นและกลิ่นรสผิดปกติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจะพบน้อย เนื่องจากใช้ระยะเวลาการเจริญเติบโตนานที่อุณหภูมิต่ำ จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียบางชนิดจะใช้ TMAO ในเนื้อสัตว์น้ำในการเจริญ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548) จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและมีบทบาทสำคัญในสัตว์น้ำเค็มจากเขตร้อนที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง คือ *Shewanella putrefaciens* และ *Pseudomonas* spp. โดย *S. putrefaciens* สามารถผลิต TMA และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เมทิลเมอร์แคปแทน (CH_3SH) ไดเมทิลซัลไฟด์ ($(CH_3)_2S$) ไฮโปแซนทีน (Hx) และกรด จากสารตั้งต้น คือ TMAO ซีสเตอีน (cysteine) เมไทโอนีน (methionine) อินโนซีนโมโนฟอสเฟต (inosine monophosphate, IMP) และคาร์โบไฮเดรต ตามลำดับ ขณะที่ *Pseudomonas* spp. ทำให้เกิดกลิ่นและกลิ่นรสเน่าเสีย (rotten) ซัลไฟดริล (sulphidedryl) และผลไม้ (fruity) ที่เกิดจากสารประกอบที่ระเหยได้แก่ อัลดีไฮด์ คีโตน เอสเทอร์ และซัลไฟด์ ดังนั้นกลิ่นต่างๆ ที่เกิดขึ้นสามารถบ่งบอกการเน่าเสียของสัตว์น้ำได้ (Gram and Huss, 1996)

Vaz-Pires และ Barbosa (2004) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ในตัวอย่างหมึกสาย (common octopus, *Octopus vulgaris*) แยกเป็น 3 ส่วน คือ บริเวณผิวหนัง หนวด และ รอบๆปาก ระหว่างเก็บรักษาในน้ำแข็ง ผลที่ได้ปรากฏว่าทั้ง 3 ส่วนมีปริมาณจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน และพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมด (total viable count, TVC) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar และ Iron agar จะได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยอาหารทั้ง 2 ชนิดมีค่าเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 10^3 cfu ต่อตารางเซนติเมตร และหมึกมีการเสื่อมเสียและไม่เป็นที่ยอมรับในวันที่ 8 โดยมีค่า TVC เท่ากับ 10^5 - 10^6 cfu ต่อตารางเซนติเมตร ค่าดังกล่าวแตกต่างจากจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียและไม่เป็นที่ยอมรับ

ของปลาซึ่งมีค่าเท่ากับ 10^7-10^9 cfu ต่อกรัม ดังนั้นการเสื่อมเสียของหมึกจึงเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่า *Shewanella putrefaciens* เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในหมึกสาย ส่วน *Psuedomonas* และ *Enterobacteriaceae* จะพบในปริมาณค่อนข้างต่ำโดยมีค่า 7.5×10^5 cfu ต่อตารางเซนติเมตร และไม่เกิน 10^3 cfu ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับเมื่อเก็บรักษาถึงวันที่ 8 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lapa-Guimarães และคณะ (2002) พบว่าการเก็บรักษาหมึกกล้วย (*Loligo plei*) แบบสัมผัสและไม่สัมผัสน้ำแข็งโดยตรง ไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทนเย็น โดยพบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นจาก 8×10^2 cfu ต่อกรัม หลังจากการจับ 1 วัน เป็น 2×10^5 ถึง 5×10^5 cfu ต่อกรัม ภายหลังจากการเก็บรักษา 10 วัน โดยปริมาณจุลินทรีย์ที่พบดังกล่าวยังอยู่ในเกณฑ์สามารถยอมรับได้ ขณะที่มีการสูญเสียคุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.5 การเปลี่ยนแปลงสี

คุณภาพทางประสาทสัมผัสของหมึกกล้วย (*Loligo plei*) ลดลงอย่างรวดเร็ว หลังจากการจับ และมีความสัมพันธ์กับการลดลงของค่าความสว่าง (sheen) ค่าสีน้ำตาลแดงของผิวหนัง รวมทั้งการย้อมติดสีของเนื้อหมึกที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสีที่ผิวหนังและกล้ามเนื้อจึงอาจใช้เป็นดัชนีคุณภาพเบื้องต้นของหมึกได้ อัตราการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้นกับระยะเวลาวิธีการเก็บรักษาและการขนส่ง (Ke *et al.*, 1984; Lakshmanan *et al.*, 1993 อ้างโดย Lapa-Guimarães *et al.*, 2002) ซึ่งการเปลี่ยนสีของผิวหนังและกล้ามเนื้อดังกล่าวจะไม่ใช่ที่ยอมรับของผู้บริโภค (Lapa-Guimarães *et al.*, 1999 อ้างโดย Lapa-Guimarães *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lapa-Guimarães และคณะ (2002) ที่พบว่าหมึกกล้วย (*Loligo plei*) มีค่าความสว่าง (L^*) ลดลง แต่ค่าสีแดง (a^*) และค่าสีเหลือง (b^*) เพิ่มขึ้น ค่าสีที่ได้สอดคล้องกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยวิธีเชิงพรรณนาที่พบว่าค่าความสว่าง (lightness) ลดลง ค่าสีชมพูเพิ่มขึ้นพร้อมกับการย้อมติดสีที่เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็งนานขึ้น โดยหมึกที่เก็บรักษาแบบไม่สัมผัสน้ำแข็งโดยตรงมีการเปลี่ยนแปลงสีรวดเร็วกว่าการเก็บรักษาแบบสัมผัสน้ำแข็งโดยตรง การเปลี่ยนแปลงสีและอัตราการเปลี่ยนแปลงจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของหมึก

3.6 การเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัส

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางประสาทสัมผัสในสัตว์น้ำภายหลังการตายแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของสัตว์น้ำ รวมทั้งวิธีการเก็บรักษา การเปลี่ยนแปลงของสัตว์น้ำ สามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

ระยะที่ 1 สัตว์น้ำมีลักษณะสด และมีรสชาติหวานอร่อย กลิ่นมีลักษณะคล้ายสาหร่ายทะเล

ระยะที่ 2 สัตว์น้ำมีการสูญเสียรสชาติและกลิ่น เนื้อมีรสจืด ลักษณะเนื้อสัมผัสอยู่ในระดับยอมรับได้

ระยะที่ 3 สัตว์น้ำมีการเสื่อมเสียโดยมีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสัตว์น้ำและสภาวะการเน่าเสีย (ภายใต้สภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ) องค์ประกอบสำคัญที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรส ประกอบด้วย TMA ซึ่งให้กลิ่นคาว (fishy) ในช่วงแรกอาจมีกลิ่นแปลกปลอม เช่น รสเปรี้ยว รสขม โดยเฉพาะมักพบในปลาที่มีไขมันสูง ในช่วงหลังมักพบกลิ่นแอมโมเนีย กลิ่นกะหล่ำปลี กลิ่นกำมะถัน และกลิ่นเหม็นหืน มีเนื้อสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อาจมีลักษณะนิ่มหรืออาจมีลักษณะแข็งกระด้าง หรือแห้ง

ระยะที่ 4 สัตว์น้ำมีลักษณะเน่าเสีย

การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางประสาทสัมผัสของสัตว์น้ำที่ผ่านการหุงต้มจะขึ้นกับระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็ง โดยมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในระยะที่ 1 และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงลดลงในช่วงที่ 2 และ 3 และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในระยะที่ 4

การประเมินค่าความสดของสัตว์น้ำโดยวิธีทางประสาทสัมผัส จะให้ผลดีเมื่อใช้ผู้ทดสอบที่มีประสบการณ์และความชำนาญ เพราะในการตรวจสอบจะต้องใช้วิธีชิมรส (taste) การดมกลิ่น (smell) การสัมผัส (touch) และการมองเห็น (sight) อย่างไรก็ตาม การมีเกณฑ์ในการตัดสินใจอาจช่วยให้การพิจารณาเป็นไปอย่างแม่นยำยิ่งขึ้น ดังนั้น ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะภายนอกของสัตว์น้ำสดแต่ละชนิดจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการตรวจสอบทางประสาทสัมผัส เพื่อนำมาประเมินค่าความสดของสัตว์น้ำต่อไป (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2548) ข้อมูลลักษณะภายนอกของหมึกหอมสดแสดงไว้ Table 2 การประเมินคุณภาพสัตว์น้ำสดโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสมีหลายวิธี ดังนี้

3.6.1 The Quality Index Method (QIM)

QIM เป็นวิธีที่พัฒนาโดย The Tasmanian Food Research Unit มีวิธีการประเมินคุณภาพในแต่ละคุณลักษณะโดยการให้คะแนน 0-4 คะแนนที่ได้จากแต่ละคุณลักษณะจะนำมารวมกันเรียกว่า “Quality Index” โดยคะแนนเท่ากับ 0 บ่งชี้ความสดมาก และคะแนนที่เพิ่มขึ้นจะบ่งบอกถึงการเสื่อมเสียของสัตว์น้ำที่เพิ่มขึ้น (สุทรวัดน์ เบญจกุล, 2548)

Luten และ Martinadottir (1997 อ้างโดย Vaz-Pires and Seixas, 2006) กล่าวว่า QIM เป็นวิธีการที่อาศัยหลักการประเมินทางตรงบอกคุณลักษณะเฉพาะของปลาสด ได้แก่ ผิวหนังตา เหงือก เป็นต้น โดยจะให้เป็นระบบคะแนนข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้น โดยมีช่วงคะแนน 0-3 ข้อบกพร่องคุณลักษณะของตัวอย่างเพียง 1 คุณลักษณะนั้นไม่สามารถปฏิเสธตัวอย่างนั้นได้ แต่จะต้องอาศัยคะแนนรวมของ QIM ซึ่ง QIM เป็นคะแนนรวมของคุณภาพทางประสาทสัมผัสจะต้อง

มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำแข็ง และสามารถใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาได้ นอกจากนี้ Barbosa และ Vaz-Pires (2004) ได้ทำการพัฒนาการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้ QIM สำหรับทดสอบหมึกสาย (*Octopus vulgaris*) ที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง โดยเกณฑ์การพิจารณาประกอบด้วย 10 พารามิเตอร์ ดัง Table 3 มีคะแนนในการพิจารณา 16 คะแนน ผลการทดสอบการยอมรับลักษณะภายนอกของหมึกสาย มีระยะเวลาในการเก็บรักษาสูงสุด 8 วัน ขณะที่ในการทดลองของนักวิจัยอื่นๆ (Hurtado *et al.*, 1999 อ้างโดย Vaz-Pires and Barbosa, 2004) มีอายุเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2.5 °C 6-7 วัน หลังจากการจับ นอกจากนี้การศึกษาของ Barbosa และ Vaz-Pires (2004) ได้ทำการศึกษาหมึกสายที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0°C จะพบกลิ่นเน่าเสียเด่นชัดในช่วงวันที่ 4 ถึง 5 ของการเก็บรักษา และไม่ยอมรับในช่วงวันที่ 8 ของการเก็บรักษา รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของสีที่ผิวหนังจะกลายเป็นสีชมพูและไม่มีสี

ส่วน Vaz-Pires และ Seixas (2006) ได้พัฒนาการทดสอบความสดของหมึกกระดอง (*Sepia officinalis*) และหมึกกล้วย (*Illex coindetii*) โดยอาศัยการทดสอบแบบ QIM ใช้ผู้ประเมินที่มีประสบการณ์ทางด้านการทดสอบทางประสาทสัมผัสของอาหารทะเลจำนวน 3 คน เพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละวันของการเก็บรักษาหมึกทั้งสองชนิดในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 13 วัน ในการทดสอบหมึกกระดองจะพิจารณา 8 พารามิเตอร์ ดัง Table 4 และคะแนนในการพิจารณาแต่ละพารามิเตอร์รวม 17 คะแนน ผลในการทดสอบการยอมรับลักษณะภายนอกของหมึกกระดองจะได้ระยะเวลาการเก็บรักษาสูงสุด 10 วัน ส่วนในการทดสอบการยอมรับของหมึกกล้วยจะพิจารณาคุณลักษณะต่างๆ 7 พารามิเตอร์ ดัง Table 5 และมีการให้คะแนนในการพิจารณา 16 คะแนน ผลในการทดสอบการยอมรับทางภายนอกของหมึกกล้วยจะได้ระยะเวลาการเก็บรักษาสูงสุด 9 วัน

Table 2 The sensory descriptors of appearance and smell of squid in ice storage.

Grading	Time estimate of sensory quality loss (days)	Sensory description						
		Appearance	Color of ventral mantle	Color of dorsal mantle	Odor	Texture	Color of head/guts	Odor of head/guts
A	0-5	very bright, well- marked colors, white in the clearest part of body	white, less color	pigments of different colors (orange, purple, brown)	seaweed or neutral	firm, consistent	bright green and pearly white	neutral/ slightly fishy
B	5-10	yellowish stains on the fins/skin loss and dull white	Tendency spots purplish and white like milky	dark purple-orange	slightly fishy and acid	slightly soft	white like milky	fishy and acid
C	10-14	yellow stains on the fins/skin loss and dull white	Tendency spots purplish and white like milky	dark purple-orange	fishy and acid	soft	very dull white	fishy and acid
D (unacceptable)	more than 14	skin loss and very dull white	dark purple and very dull white	very dark purple	acid, putrid	flaccid	very dull white like milky with blue	acid, putrid

ที่มา: กองควบคุมตรวจสอบผลิตภัณฑ์และการแปรรูปสัตว์น้ำ (2542)

Table 3. QIM scheme for whole raw octopus (*Octopus vulgaris*) in crushed ice.

Freshness quality parameter	Description		QIM score	
Skin	Appearance	Very bright, Well-marked colors, White in the cleares parts of the body, skin elastic	0	
		Bright, less colored, slightly pink in the clearest parts of the body, skin with low elasticity	1	
		Less bright, colorless, orange or brown spots, color somewhat more orange, rose in the clearest parts of the body, shrunken skin	2	
	Odor	Seaweedy, (sea) fresh	0	
		Slightly seaweedy, slightly grassy, neutral	1	
		Metallic, grassy, acid, intense	2	
	Mucus	Transparent, watery	0	
		Slightly milky, viscous(sticky), moderate or absent	1	
	Flesh	Texture	Firm, tense	0
			Flaccid, soft	1
Eyes	Cornea	Translucent	0	
		Slightly opalescent	1	
		Opalescent	2	
	Pupil	Black, shining	0	
		Black, dark red, muddy	1	
		Dark red, opaque, normally, bloodstained	2	
Mouth region	Color	White, yellowish	0	
		Slightly rose	1	
	Odor	Seaweedy or neutral	0	
		Sulphurous, citric, sweet, acid	1	
	Mucus	Clear	0	
		Milky	1	
Yellowish		2		
Arms	Material in the sucker	As a film all over the sucker	0	
		Starting to agglomerate in the centre of the sucker	1	
		Completely agglomerated in the centre of the sucker	2	
Rang of QIM score			0-16	

ที่มา: Vaz-Pires และ Barbosa (2004)

Table 4. QIM scheme for whole raw cuttlefish (*Sepia officinalis*) in crushed ice.

Freshness quality parameter	Description		QIM score
Skin (dorsal side)	Appearance /Color	Very bright, dark brown or brown, iridescent reflexes all over the mantle	0
		Bright, becoming white-beige or light-grey	1
		Rather dull, rose-purplish specially in the fin and sides of body	2
		Dull, purplish in the sides, central portion of the mantle becomes brownish	3
		Odor	Seaweedy, (sea) fresh
		Slightly seaweedy, neutral	1
		Metallic, fishy	2
	Mucus	Transparent, watery, shining	0
		Slightly milky, moderate or absent	1
	Skin (ventral side)	Elasticity/color	Elastic, very firm, white
Soft, wrinkles when pulled, pink			1
Flesh	Texture	Very firm, tense, consistent	0
		Firm, less consistent	1
		Flaccid, soft	2
Eyes	Cornea	Translucent, watery, shining	0
		Slightly opalescent	1
		Opalescent	2
	Pupil	Black shining	0
		Black, tarnished	1
		Dark red, red bloody	2
Mouth region	Odor	Seaweedy, fresh	0
		Neutral	1
		Slightly fishy	2
		Fishy, intense, sulphurous	3
Internal “bone”	Connection bone/head	Firmly attached to the upper part of the head region	0
		Loosely attached to the upper part of the head region	1
Rang of QIM score			0-17

ที่มา: Vaz-pires และ Seixas (2006)

Table 5. QIM scheme for whole raw squid (*Illex coindetii*) in crushed ice.

Freshness quality parameter		Description	QIM score
Skin (dorsal side)	Appearance /Color	Very bright, well defined pigment of different sizes and color (brown, purple, rose and dark red), iridescent skin	0
		Bright, becoming discolored	1
		Rather dull, without shine, purplish in the central axis of the body, general orange/pink areas	2
		<hr/>	
	Odor	Seaweedy, (sea) fresh	0
		Slightly seaweedy	1
		Neutral, slightly fishy	2
		Metallic, fishy, intense	3
	<hr/>		
	Mucus	Transparent, watery, shining	0
		Slightly milky, moderate or absent	1
	<hr/>		
Flesh	Texture	Firm, tense, consistent	0
		Soft, less consistent	1
		Flaccid, flabby	2
<hr/>			
Eyes	Shape/appearance	Convex	0
		Flat	1
		Concave	2
	<hr/>		
	Ocular tissue	Translucent, watery	0
		Slightly opalescent	1
Opalescent		2	
<hr/>			
Mouth region	Odor	Seaweedy, fresh	0
		Neutral	1
		Slightly fishy	2
		Fishy, intense, acid	3
	<hr/>		
	Mucus	Absent or clear transparent	0
		Slightly yellowish	1
<hr/>			
Rang of QIM score		0-16	

ที่มา: Vaz-Pires และ Seixas (2006)

3.6.2 EEC method

โรงงานอุตสาหกรรมของประเทศต่างๆ ในทวีปยุโรปใช้ EU Freshness Grading หรือ EC scheme เป็นเกณฑ์การประเมินคุณภาพสัตว์น้ำ ครั้งแรกในที่ประชุมเลขที่ 103/76 สำหรับปลา เลขที่ 104/76 สำหรับครัสเตเชีย และเลขที่ 2406/96 สำหรับ ปลาบางชนิด ครัสเตเชียบางชนิด หอย และหมึก (Vaz-Pires and Barbosa, 2004) โดยการจัดระดับคุณภาพสัตว์น้ำเป็น 3 ระดับชั้น คือ E (Extra) มีคุณภาพสูงสุด A คุณภาพดี B คุณภาพพอใช้ และบางครั้งหากคุณภาพต่ำกว่า B อาจจะ ใช้ C (Vaz-Pires and Seixas, 2006)

เกณฑ์ที่ใช้ในการทดสอบความสดทางประสาทสัมผัสของหมึกกระดองสามารถใช้หลักเกณฑ์ในการพิจารณา ดัง Table 6 และ Table 7 เป็นเกณฑ์ที่ทดสอบความสดทางประสาทสัมผัสของ หมึกสายที่ดัดแปลงมาจากเกณฑ์ที่ใช้ในการทดสอบความสดทางประสาทสัมผัสของ หมึกกระดอง

Table 6. EC scheme for cephalopods, applicable to cuttlefish.

Criteria	Freshness categories		
	Extra	A	B
Skin	Bright pigmentation, skin sticks to flesh	Dull pigmentation, skin sticks to flesh	Discolor; easily detached from flesh
Muscle	Very firm; pearly white	Firm; chalky white	Slightly soft; pinky white or slightly yellowing
Tentacles	Resistant to removal	Resistant to removal	More easily removed
Smell	Fresh; seaweed	Slightly or no smell	Ink smell

ที่มา: Anonymous (1996 อ้างโดย Vaz-Pires and Barbosa, 2004)

Table 7. Modified EC scheme for octopus (*Octopus vulgaris*).

Criteria	Freshness categories			
	Extra	A	B	Unfit
Skin	Very Bright and uniform pigmentation, skin elastic	Bright and less uniform pigmentation, slight orange or pink coloring appears; skin less elastic	Slight dull pigmentation, skin stained and less elastic	Dull and discolored pigmentation; pinky; elasticity almost absent
Muscle	Very firm	Firm	Slightly soft	Soft
Smell	Seaweed; algae	Slightly seaweed or neutral	Slightly metallic, grassy	Metallic, fecal, sweet, acid, spoiled fish

ที่มา: ดัดแปลงจาก Vaz-Pires และ Barbosa (2004)

3.6.3 วิธีพรรณนาเชิงปริมาณ (Quantitative Descriptive Analysis, QDA)

QDA เป็นวิธีการวัดและอธิบายลักษณะทางประสาทสัมผัส ในเชิงปริมาณหรือตัวเลขโดยผู้ทดสอบจะต้องได้รับการฝึกฝนอย่างเพียงพอ คุณภาพทางประสาทสัมผัสที่อธิบายได้แก่ ลักษณะที่ได้จากการมองเห็น กลิ่น กลิ่นรส และเนื้อสัมผัส โดยมีการกำหนดความเข้มของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่จะทดสอบและระบุลงในสเกลที่เป็นเส้นยาว 6 นิ้ว หรือ 15 เซนติเมตร การวิเคราะห์ผลทำได้โดยการวัดความอ่อนเข้มของแต่ละลักษณะเป็นตัวเลข และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ นอกจากนี้สามารถนำค่าเฉลี่ยไปทำกราฟไทมมมได้ (Erickson and Hung, 1997)

Stone และ Sidel (1994 อ้างโดย Hyldig *et al.*, 2002) กล่าวว่า ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธี QDA ผู้ทดสอบจะต้องดำเนินการกำหนดคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ โดยใช้ผู้นำในการทดสอบเป็นผู้ดำเนินการ ผู้ทดสอบชิมจะต้องได้รับการฝึกฝนการให้ระดับคะแนนในแต่ละคุณลักษณะก่อน QDA ใช้กันอย่างทั่วไป และใช้เป็นข้อมูลที่ดำเนินการควบคู่กับการทดสอบทางเคมี และทางกายภาพ และใช้เป็นข้อมูลที่จะบ่งบอกความจำเพาะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ให้ลูกค้าได้อีกด้วย

Hyldig และคณะ (2002) ได้ทำการทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัสสำหรับปลาแอตแลนติกแซลมอนที่เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็ง โดยได้ทำการทดสอบปลาแอตแลนติกแซลมอนสดด้วยวิธี QIM และทดสอบปลาแอตแลนติกแซลมอนสุกด้วยวิธี QDA ตามวิธีของ Stone และ Sidel

(1992) เพื่อหาอายุการเก็บรักษา การทดสอบจะใช้เนื้อปลาแล่และทำให้สุก ทำการสุ่มรหัสสำหรับแต่ละตัวอย่าง และนำไปอบด้วยเตาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผู้ทดสอบจะกำหนดค่าสำหรับอธิบายลักษณะของกลิ่น กลิ่นรส ลักษณะปรากฏ และเนื้อสัมผัส โดยใช้สเกลเป็นเส้นยาว 15 เซนติเมตร ผู้ทดสอบจะได้รับตัวอย่างที่สุ่มในวันที่เก็บรักษา 3 วัน จะใช้ค่าสำหรับอธิบายกลิ่น และกลิ่นรสของปลาแอตแลนติกแซลมอน โดยแบ่งเป็นตัวแปรเชิงบวกซึ่งใช้บ่งบอกความสดของตัวอย่าง และตัวแปรเชิงลบจะใช้บ่งบอกการเน่าเสียในตัวอย่าง แสดงดัง Table 8 พบว่าวิธี QIM ที่ใช้กับปลาแอตแลนติกแซลมอนสด สามารถเก็บรักษาสูงสุด 20 วัน ส่วนวิธี QDA ที่ใช้กับปลาแอตแลนติกแซลมอนสุก สามารถเก็บรักษาสูงสุด 21-22 วัน ในสภาวะการเก็บรักษาในน้ำแข็ง

Table 8. Attributes of cooked salmon samples assessed by the QDA method.

Appearance	Odour	Flavour	Texture
Discoloration (-) other	Seaweed (+)	Seaweed (+)	FLAKINESS
	CUCUMBER (+)	SWEETISH ^a (+)	FIRMNESS
	SOURISH ^b (+)	SOURISH ^b (+)	juiciness
	RANCID (-)	FISH OIL (+)	other
	sour (-)	MUSHROOM (+)	
	AMINE (-)	RANCID (-)	
	other	Mushy-sweet (-)	
		sour (-)	
		amine (-)	
		other	

Positive attributes are marked with (+), negative with (-) and the best sensory terms are designatured in capital letters.

^a The term sweetish was used in QDA to describe sweet flavour (positive) to distinguish from the term mushy-sweet (negative).

^b The term sourish was used in QDA to describe odour and flavour that could best be described as fresh (positive) –sour to distinguish form the term sour.

ที่มา: Hyldig และคณะ (2002)

จากการศึกษาของ Lapa-Guimarães และคณะ (2002) ใช้ผู้ทดสอบ 14 คน เพื่อหาความแตกต่างของหมึกกล้วย (*Loligo plei*) ในระหว่างการเก็บรักษาแบบสัมผัสน้ำแข็งโดยตรงและแบบไม่สัมผัสน้ำแข็งโดยตรงหลังจากการจับ 1 วันจนถึงระยะเวลาการเก็บรักษา 16 วัน โดยหมึกกล้วยที่ใช้สำหรับทดสอบ แบ่งเป็น 2 รูปแบบ คือ หมึกกล้วยทั้งตัวไม่เอาเครื่องในออก และส่วนของลำตัวที่ลอกหนัง มีขนาดขึ้นกว้าง 5 เซนติเมตร และยาว 3 เซนติเมตร ทำการให้คะแนนตามคุณลักษณะต่างๆ ดังนี้ ลักษณะปรากฏของกล้ามเนื้อ (สังเกตลักษณะสี รอยต่างบนกล้ามเนื้อ และความใสของผิว) และสำหรับกลิ่น (กลิ่นสด และกลิ่นเน่าเสีย) และลักษณะปรากฏภายนอก (ความอ่อนนุ่ม ตาขุ่นและความเข้มของสีชมพูบนผิว) ในการให้คะแนนจะใช้เป็นสเกลแบบเส้นยาว 9 เซนติเมตร หลังจากการเก็บรักษา 16 วัน พบว่าหมึกกล้วยที่เก็บรักษาทั้งสองแบบมีคุณลักษณะของสี และกลิ่นสดลดลง ขณะที่ผิวที่ลำตัวเกิดสีชมพู มีกลิ่นเน่าเหม็น ลักษณะปรากฏนุ่มและตาขุ่นเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหมึกสด (หลังจากการจับ 1 วัน) ดัง Figure 6

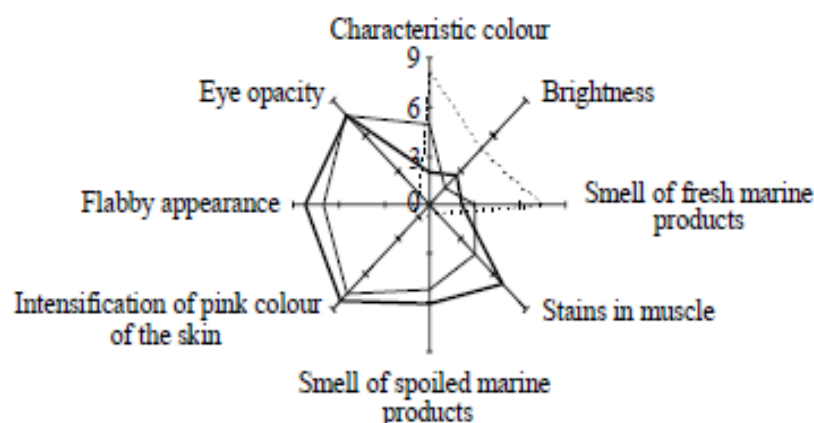


Figure 6. An example of a cobweb or radar plot of QDA. The data are from descriptive analysis of squids evaluated 1 day after capture and at the end of the storage time (16 days) in the contact ice (CI) and non-contact ice (NC) storage methods. 1 day (---), CI (-), NC (—)

ที่มา: Lapa-Guimarães และคณะ (2002)

3.6.4 การทดสอบคุณภาพโดยรวม (Overall Quality)

การทดสอบคุณภาพโดยรวมเพื่อใช้สำหรับจัดระดับคุณภาพของตัวอย่างในเกณฑ์ที่สามารถยอมรับหรือไม่ยอมรับ ดัง Figure 7 ในการทดสอบนั้นจะทำการเปรียบเทียบตัวอย่างกับตัวอย่างมาตรฐาน (ตัวอย่างที่บ่งบอกถึงคุณภาพที่ดี) และให้คะแนนเพื่อจัดระดับคุณภาพของตัวอย่างนั้น (Lawless and Heymann, 1998)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reject		Unacceptable			Acceptable			Match	
คะแนน 1 และ 2		หมายถึง ตัวอย่างแตกต่างจากตัวอย่างมาตรฐานในระดับปฏิเสธ							
คะแนน 3 - 5			หมายถึง ตัวอย่างแตกต่างจากตัวอย่างมาตรฐานในระดับไม่ยอมรับ						
คะแนน 6 - 8				หมายถึง ตัวอย่างแตกต่างจากตัวอย่างมาตรฐานแต่ยังยอมรับได้					
คะแนน 9 - 10					หมายถึง ตัวอย่างมีความใกล้เคียงหรือเหมือนตัวอย่างมาตรฐาน				

Figure 7. The scale for Overall Quality.

ที่มา: Lawless และ Heymann (1999)

4. ผลของการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งต่อคุณภาพของสัตว์น้ำ

การแช่เยือกแข็งเป็นการช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารให้นานขึ้น ช่วยรักษารสชาติ เนื้อสัมผัส และปริมาณสารอาหาร ได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ แต่จะต้องมีการควบคุมกระบวนการในการแช่เยือกแข็ง การเตรียมอาหารก่อนการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาอาหารหลังจากแช่เยือกแข็ง เพื่อให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาให้นานขึ้น วิธีแช่เยือกแข็งอาหารแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ การแช่เยือกแข็งแบบช้า (slow freezing) เป็นวิธีการทำให้น้ำทั้งภายในและภายนอกอาหารแข็งตัวอย่างช้าๆ ทำให้เกิดนิวเคลียสของน้ำแข็งจำนวนน้อย แต่ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ ส่งผลให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นทิ่มแทงผนังเซลล์ของอาหารที่แช่เยือกแข็งลักษณะ ทำให้สูญเสียคุณภาพของอาหารได้ อีกวิธีของการแช่เยือกแข็งคือ การแช่เยือกแข็งแบบเร็ว (quick freezing หรือ fast freezing) เป็นวิธีที่ทำให้น้ำทั้งภายในและภายนอกอาหารกลายเป็นน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจึงมีขนาดเล็ก จึงมีผลทำลายเซลล์อาหารน้อยกว่ากับการแช่เยือกแข็งแบบช้า (George, 1997) อย่างไรก็ตามในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ทางกายภาพ ในระดับเนื้อเยื่อ ระดับเซลล์ จนกระทั่งระดับโมเลกุล ส่งผลให้เกิดการสูญเสียคุณภาพสัตว์น้ำ โดยสัตว์น้ำแช่เยือกแข็งจะสูญเสียความชื้นและมีเนื้อสัมผัสที่เหนียวยากต่อการบดเคี้ยวเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น นอกจากนี้ยังสูญเสียกลิ่นและกลิ่นรสสดคล้ายสาหร่ายของสัตว์น้ำ ตลอดจนการเกิดกลิ่นหรือกลิ่นรสที่ผิดปกติ (off-flavor) ได้แก่ การเกิดกลิ่นหืนจากสารประกอบต่างๆ เช่น กรดไขมันประกอบคาร์บอนิล ที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมันและกลิ่นแอมโมเนียจากการย่อยสลายของ TMAO (Jiang and Lee, 2004) ปัจจัยที่มีผลต่อการเสื่อมเสียดังกล่าวขึ้นกับคุณภาพของสัตว์น้ำเริ่มต้น การเตรียมก่อนการแช่เยือกแข็ง อัตราการแช่เยือกแข็ง อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บ

รักษา ประสิทธิภาพในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงโปรตีน และการออกซิเดชัน (Sikorski and Pan, 1994)

4.1 การเสถียรภาพโปรตีน

การเสถียรภาพโปรตีนระหว่างการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง เกิดจากปัจจัยต่างๆ ดัง Figure 8 โดยส่งผลให้เกิดการสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น ความสามารถในการอุ้มน้ำ (water-holding ability) ความหนืด (viscosity) การเกิดเจล (gelation) การเกิดฟอง (foaming) และการละลายของโปรตีน (solubility) เป็นต้น (Xiong, 1997)

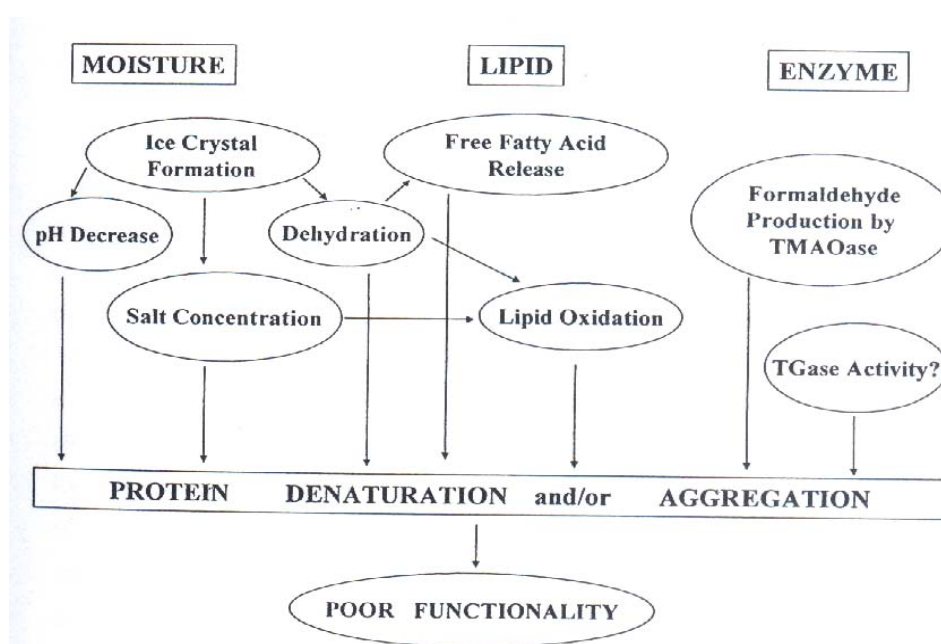


Figure 8. Factors that Affect, directly or indirectly, muscle protein denaturation and consequent loss of protein functionality during frozen storage.

ที่มา : MacDonald and Laier (1991)

ในสภาพปกติโครงสร้างของโปรตีนจะคงอยู่ในสภาพธรรมชาติ (native form) โดยโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จะจัดเรียงตัวเป็นโครงข่ายสามมิติ (three-dimensional network) และมีการจับโมเลกุลของน้ำไว้ภายใน (Zayas, 1997 อ้างโดย Dublan-Garcia *et al.*, 2005) แต่ในระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็ง โมเลกุลของน้ำจะเคลื่อนย้ายออกจากโมเลกุลของโปรตีนเพื่อสร้างผลึกน้ำแข็ง ทำให้ไปทำลายพันธะไฮโดรเจนที่เป็นพันธะสำคัญต่อการรักษาความคงตัวของโปรตีน นอกจากนี้ยังมีผลทำให้หมู่หน้าที่ทั้งชนิดที่เป็นส่วนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ภายใน โมเลกุลของโปรตีนไม่ได้รับการป้องกันจากโมเลกุลน้ำ ส่งผลต่อการ

เปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีนได้ง่ายขึ้น และในขณะที่น้ำภายในเซลล์เปลี่ยนเป็นน้ำแข็งนั้น ความเข้มข้นของเกลือ สารอินทรีย์และของแข็งต่างๆ ที่อยู่ในส่วนของน้ำที่ยังไม่เปลี่ยนเป็นน้ำแข็งเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความแรงของไอออน (ionic strength) และการเปลี่ยนแปลงพีเอชซึ่งจะเปลี่ยนไปในทิศทางที่เป็นกรด การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลให้เกิดการสูญเสียสภาพของโปรตีน สำหรับสัตว์น้ำบางชนิดโดยทั่วไปจะมี TMAO เป็นองค์ประกอบในกล้ามเนื้อ หลังจากการตาย TMAO จะถูกเปลี่ยนเป็น DMA และ FA โดยเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนดีเมทิลเลส (trimethylamine demethylase, TMAOaes) ภายในกล้ามเนื้อหรือเปลี่ยนโดยไมเอนไซม์ (non-enzymatic) ในกระบวนการรีดักชันในสภาวะที่มีเหล็กหรือฮีโมโกลบินเป็นตัวเร่ง ซึ่งเหล็ก (Fe^{2+}) ในปริมาณสูงจะสามารถรีดิวซ์ TMAO ได้เช่นกัน (สุทรวัดน์เบญจกุล, 2548) แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะทำให้ไปยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าว โดยออกซิเจนจะไปจับกับไอออนของโลหะ (metal ions) ส่งผลให้เปลี่ยน TMAO เป็น DMA และ FA ลดลง (Sista *et al.*, 1997; Jaing and Lee, 2004) สอดคล้องกับการศึกษาในเนื้อปลาแฮดแดง (Lundstrom *et al.*, 1981 อ้างโดย Jaing and Lee, 2004) และปลาปากคม (Leelapongwattana *et al.*, 2005) ที่พบว่าเนื้อปลาที่เก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะพบการเกิด DMA และ FA มากกว่าเนื้อปลาที่เก็บรักษาในสภาวะที่มีออกซิเจน

FA สามารถจับกับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว โดย FA 1 โมเลกุลสามารถเกิดแรงกระทำกับหมู่อะมิโน 2 หมู่และเชื่อมประสานระหว่างสายโซ่ของโปรตีน ส่งผลให้การละลายของโปรตีนในสารละลายเกลือลดลง นอกจากนี้ FA ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนจากเนื้อปลาคอด โดยทำให้หมู่ที่เป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic aliphatic group) ออกมาข้างนอกโครงสร้างและทำให้เกิดการเชื่อมประสานโดยพันธะโควาเลนต์ (Careche and Li-Chan, 1997) การศึกษาของ Ueng และ Chow (1998) พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน หมึกทั้ง 3 สายพันธุ์ (*Loligo edulis*, *Sepia pharaonis* และ *Illex argentinus*) มีความเหนียวเพิ่มขึ้น และความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง เมื่อเก็บรักษาในสภาวะแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลาสั้น เมื่อตรวจสอบลักษณะเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (phase contrast) แสดงให้เห็นว่ามัดของเส้นใยกล้ามเนื้อถูกทำลาย และมีการรวมตัวกันแน่นขึ้นระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งอาจเกิดจากการเกิดและการเพิ่มขึ้นของผลึกน้ำแข็ง รวมทั้งการเชื่อมประสานของโปรตีนที่เกิดจากการเหนียวตัวของ DMA และ FA ส่งผลให้เนื้อหมึกมีความเหนียวเพิ่มขึ้น (Stanley and Hultin, 1982 อ้างโดย Ueng and Chow, 1998) นอกจากนี้ Leelapongwattana และคณะ (2005) กล่าวว่า การละลายของโปรตีนของเนื้อปลาปากคมบดระหว่างการเก็บรักษาสภาวะแช่เยือกแข็งมีค่าลดลงเนื่องจากกิจกรรมของ

FA โดยเกิดพันธะไคซัลไฟด์ พันธะไฮโดรเจน และพันธะไฮโดรโฟบิกรวมทั้งการเชื่อมต่อของหมู่เมทิลีน (methylene bridges)

4.2 การเปลี่ยนแปลงของไขมัน

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและเคมีของไขมันในสัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง มักมีบทบาทต่อการสูญเสียคุณภาพระหว่างการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิส และการออกซิเดชันของไขมัน มักจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสี การเกิดกลิ่นผิดปกติและปฏิกิริยากับโปรตีน ส่งผลให้เนื้อสัมผัสของเนื้อสัตว์น้ำไม่เป็นที่ยอมรับ ตลอดจนการเกิดสารพิษ (Sikorski and Pan, 1994; Erickson, 1997) โดยกลิ่นรสที่เกิดขึ้นจากการเกิดออกซิเดชัน คือ กลิ่นหืน (rancid) ที่เกิดจากแอลดีไฮด์ (aldehyde) คีโตน (ketone) แอลกอฮอล์ (alcohol) ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ฟูเรน (furan) และกรด (acid) ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่ใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ คือ อุณหภูมิ ค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity) ค่าพีเอช แสง และออกซิเจน (Erickson, 1997) สารประกอบที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน เช่น มาโลนัลดีไฮด์ (malonaldehyde) โพรพานอล (propanol) และเฮกซะนอล (hexanal) (Shenouda, 1980 อ้างโดย Jaing and Lee, 2004) สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่หน้าที่ที่จำเพาะกับสายโซ่ข้างของโปรตีน ได้แก่ หมู่ซัลไฟไฮดริล (-SH) ของซิสเตอีน (cysteine) หมู่อะมิโนของไลซีน (lysine) และที่ตำแหน่ง N-terminal ของกรดแอสพาทิก (aspartic acid) ไทโรซีน (tyrosine) เมทไทโอนีน (methionine) และอาร์จินีน (arginine) (Konosu *et al.*, 1974 อ้างโดย Jaing and Lee, 2004) ซึ่งอันตรกิริยาดังกล่าวส่งผลให้ไปเพิ่มส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของโปรตีน ทำให้โปรตีนละลายน้ำได้น้อยลง ส่วนปฏิกิริยาออกซิเดชัน (autoxidation) ของลิพิดทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกับโปรตีน ส่งผลให้โปรตีนอยู่ในรูปของ protein-free radical ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมประสานกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีนหรือระหว่างโปรตีนกับลิพิด นอกจากนี้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันมีผลให้ปริมาณของกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น และมีผลโดยตรงกับเนื้อสัมผัสที่เกิดจากการเสถียรภาพของโปรตีน โดยกรดไขมันอิสระจะเข้าไปจับกับโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์โดยเฉพาะแอกโตไมโอซิน ทำให้โมเลกุลโปรตีนล้อมรอบไปด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการสกัดของโปรตีนลดลง (Edith, 2004; Jaing and Lee, 2004)

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันของหมึกกล้วย (Thanonkaew *et al.*, 2006b) และหมึกกระดอง (Thanonkaew *et al.*, 2007) ซึ่งแสดงจากค่า Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ที่สูงขึ้น และเป็นไปในทางเดียวกันกับการเพิ่มขึ้นของค่าสีเหลือง (b^*) และสรุปว่า ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไขมันและการเปลี่ยนแปลงสีของกล้ามเนื้อหมึกอาจเกิด

จากปฏิกิริยาสีน้ำตาลโดยไม่ใช่เอนไซม์ที่เกิดขึ้นระหว่างสารประกอบแอลดีไฮด์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไมโทคอนไดรียมของหมึกกล้วยหรือผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไขมันในไลโปโซมของหมึกกระดองกับหมู่เอมีนของฟอสโฟลิปิด (phospholipids head groups) เกิดเป็นสารประกอบที่ซับซ้อนและมีสีเหลือง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกปัจจัยคุณภาพที่เหมาะสมในการบ่งชี้ถึงคุณภาพหรือความสดของหมึกกล้วยและหมึกกระดอง ที่เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง และการแช่เยือกแข็ง
2. เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาหมึกในน้ำแข็งและในสภาพแช่เยือกแข็งที่ผู้บริโภคสามารถยอมรับได้
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนและโครงสร้างจุลภาคซึ่งส่งผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของหมึกกล้วย และหมึกกระดอง ที่เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็งและในสภาพแช่เยือกแข็งในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ขอบเขตของโครงการ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี จุลินทรีย์ ภายนอก และทางประสาทสัมผัสของหมึกกล้วย และหมึกกระดองที่เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็งและการแช่เยือกแข็ง เพื่อพิจารณาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาในน้ำแข็ง รวมทั้งปัจจัยคุณภาพทางตรงที่บ่งบอกความสดหรือคุณภาพของหมึกทั้งสองสายพันธุ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นเกณฑ์พิจารณาคุณภาพของหมึกกล้วย และหมึกกระดอง
2. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาหมึกกล้วย และหมึกกระดอง ในน้ำแข็งและแช่เยือกแข็ง
3. ผลของการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างจุลภาคที่มีต่อเนื้อสัมผัสของหมึกกล้วย และหมึกกระดอง ระหว่างเก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง และการแช่เยือกแข็ง

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. หมึกกระดอง (*Sepia aculeata*) ขนาด 80-150 กรัม/ตัว และหมึกกล้วย (*Photololigo duvaucelii*) ขนาด 20-28 กรัม/ตัว จากทะเลฝั่งอ่าวไทย ระยะเวลาหลังจากการจับจนถึงฝั่งไม่เกิน 48 ชั่วโมง นำมาบรรจุลงพลาสติกที่มีฉนวนโดยวางหมึกสลับน้ำแข็ง ในอัตราส่วนน้ำแข็งต่อหมึกเท่ากับ 2:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) นำไปคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ภายใน 1 ชั่วโมง

- น้ำแข็ง คุณภาพตามมาตรฐานน้ำแข็ง (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 78, 2527)
- สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

โซเดียมโคเคซิลซัลเฟต (SDS), เบต้า-เมอแคปโตเอทานอล, กลีเซอรอล, โบวิน-ซีรัมอัลบูมิน, โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง, โพลีนีฟอล, โคแมสซึบลู R-250 จาก Sigma (St. Louis, MO, USA) กรดไฮโดรคลอริก, เอทานอล จาก Fisher Chemicals (Morris Plains, NJ, USA) อะคลีตามายด์, แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (TEMED), บีส-อะคลีตามายด์ และยูเรีย จาก Fluka (Buchs, Switzerland) อาหารเลี้ยงเชื้อ (plate count agar) จาก Himedia (Mumbai, India) สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อเกรดสำหรับการวิเคราะห์

อุปกรณ์

- ถุงพลาสติกใส ชนิดโพลีเอทิลีน ขนาด 20x25 เซนติเมตร หนา 85 ไมโครเมตร
- ถังน้ำแข็งพลาสติกชนิดที่มีฉนวน ขนาด 35 ลิตร
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น Docu-pH meter, Goettingen, ประเทศเยอรมันนี
- เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) ยี่ห้อ STABLE MICRO SYSTEM รุ่น TA-XT2i, Surrey, ประเทศอังกฤษ
- เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ HUNTER LAB รุ่น Color Flex, McLean, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-16001, Kyoto, ประเทศญี่ปุ่น
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) ยี่ห้อ JEOL รุ่น

JSM 5800 LV, Tokyo, ประเทศญี่ปุ่น

8. เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermocouple) ยี่ห้อ UNION รุ่น UN-305A ประเทศอังกฤษ
9. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางเคมี
10. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์
11. อุปกรณ์สำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส

วิธีการ

1. การศึกษาปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นดัชนีความสดของหมึกกล้วย และหมึกกระดองที่เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง

เมื่อขนส่งหมึกทั้งสองชนิดมาถึงห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตรแล้ว นำหมึกทั้งสองชนิดบรรจุในถังน้ำแข็ง โดยวางหมึกเป็นชั้นสลับกับน้ำแข็งภายในถังน้ำแข็งชนิดมีฉนวน อัตราส่วนน้ำแข็งต่อหมึก 2:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ควบคุมอุณหภูมิภายในถังน้ำแข็งให้อยู่ระหว่าง 0-4 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิภายในถังน้ำแข็งและในส่วนลำตัวของหมึกทั้งสองชนิด กำหนดความถี่ในการวัดอุณหภูมิทุกๆ 3 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนน้ำแข็งและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อหมึกในส่วนลำตัว ในวันที่ 0 และทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งมีคุณภาพอยู่ในระดับที่ไม่ยอมรับทางประสาทสัมผัส โดยวิธีการทดสอบคุณภาพโดยรวม (คะแนนระดับ 1 (reject)) ดังนี้

1.1 การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

โดยนำตัวอย่างส่วนลำตัวของหมึกทั้งสองชนิดที่เก็บรักษาทำการลอกหนังและนำมาวิเคราะห์ค่าดังนี้

- Trichloroacetic acid (TCA)-soluble peptide ตามวิธีการทดสอบของ Morrissey และคณะ (1993) (ดังแสดงในภาคผนวก ก4)
- Trimethylamine nitrogen (TMA-N) ด้วยวิธี Conway Unit ตามวิธีการทดสอบของ Hasegawa (1987) (ดังแสดงในภาคผนวก ก1)
- Total volatile basic nitrogen (TVB-N) ด้วยวิธี Conway Unit ตามวิธีการทดสอบของ Hasegawa (1987) (ดังแสดงในภาคผนวก ก1)
- Ammonia ตามวิธีการทดสอบของ Paris และ Foglia (1983) (ดังแสดงในภาคผนวก ก6)
- pH ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ ตามวิธีการทดสอบของ Dublán-Garcia และ

คณะ (2005) (ดังแสดงในภาคผนวก ง4)

1.2 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

โดยนำตัวอย่างส่วนลำตัวของหมึกทั้งสองชนิดที่เก็บรักษาที่ไม่ทำการลอกหนัง และนำมาวิเคราะห์ค่าดังนี้

- Total Variable Count (TVC) ตามวิธีการทดสอบของ Speck (1976) (ดังแสดงในภาคผนวก จ1)
- Psychrophilic count คัดแปลงวิธีการทดสอบของ Speck (1976) (ดังแสดงในภาคผนวก จ2)

1.3 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- แร่งเนื้อด้วยเครื่อง Texture Analyzer รุ่น TA-XT2i ตามวิธีการทดลองของ Dublán-Garcia และคณะ (2005) โดยใช้ Warner-Blatzler Blade ตัดชิ้นเนื้อส่วนตรงกลางลำตัวของหมึกสดทั้งสองชนิดที่ทำการลอกหนังตามแนวตั้งฉากกับเส้นไขกกลมเนื้อ (ดังแสดงในภาคผนวก ง 5)
- ค่าสี โดยระบบ $L^*a^*b^*$ ด้วยเครื่อง Hunter Lab โดยวัดส่วนของลำตัวด้านหลังที่ทำการลอกหนังโดยสุ่มตำแหน่งที่วัดค่า 5 จุด (ดังแสดงในภาคผนวก ง3)
- Expressible drip ตามวิธีการทดสอบของ Hasegawa (1987) โดยตัดชิ้นเนื้อส่วนลำตัวของหมึกทั้งสองชนิดที่ทำการลอกหนัง (ดังแสดงในภาคผนวก ง1)

1.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

1.4.1 การฝึกฝนผู้ทดสอบ

1.4.1.1 อธิบายวัตถุประสงค์ บทบาทของผู้ทดสอบ วิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบคำนิยามและขั้นตอนของการประเมินคุณลักษณะต่างๆ ของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่จะทำการประเมินให้ผู้ทดสอบทราบและทำความเข้าใจให้ตรงกัน

1.4.1.2 ทำการฝึกฝนให้ผู้ทดสอบมีความคุ้นเคยกับตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บรักษาในระยะเวลาต่างๆ เพื่อสังเกตลักษณะที่ปรากฏในตัวอย่าง เช่น ลักษณะปรากฏ/สี และเนื้อสัมผัส เป็นต้น และการเปลี่ยนแปลงของกลิ่น รวมทั้งการใช้กลิ่นมาตรฐาน ซึ่งเป็นกลิ่นที่พบในหมึกทั้งสองชนิดในระหว่างในเก็บรักษาจนเกิดการเสื่อมเสีย ดังนี้ กลิ่นน้ำทะเล (briny) กลิ่นแตงกวา (cucumber) กลิ่นโลหะ (metallic) กลิ่นกล่องกระดาษ (cardboard) กลิ่นออกซิไดซ์ (oxidize) กลิ่นเปรี้ยว (sour) กลิ่นเหม็นหืน (rancid) กลิ่นกะหล่ำปลี (turnipy) กลิ่นแอมโมเนีย (ammonia) และกลิ่นเน่าเสีย (putrid) (U.S. Food and Drug

Administration, 2005) ฝึกฝนจนกระทั่งผู้ทดสอบสามารถบอกกลิ่นที่ปรากฏได้ จากนั้นให้ผู้ทดสอบประเมินตัวอย่างเพื่อทดสอบความถูกต้องและมีความแม่นยำในการประเมินมากขึ้น ซึ่งจะทำการศึกษาฝึกฝนและประเมินอาทิตย์ละ 2 ครั้งเป็นเวลา 1 เดือน

1.4.1.3 ทดสอบความแม่นยำในการประเมินของผู้ทดสอบโดยผู้ทดสอบแต่ละคนมีคะแนนเฉลี่ยไม่แตกต่างกันมากหรือมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำและมีแนวโน้มการให้คะแนนเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

1.4.2 วิธีการทดสอบ

ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 12 คน ประเมินคุณภาพหมึกสดทั้งตัว (ตัวอย่างละ 8-10 ตัว) จากลักษณะของส่วนต่างๆ

- ผิวหนัง (skin) โดยตรวจสอบความสมบูรณ์ของผิวหนัง ลักษณะโดยรวม (appearance), สี (color), กลิ่น (odor) และเมือก (mucus)
- เนื้อ (flesh) โดยทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัส (texture)
- ตา (eyes) โดยตรวจสอบลักษณะปรากฏ
- บริเวณปาก (mouth region) โดยตรวจสอบ สี (color), กลิ่น (odor), เมือก (mucus) โดยใช้วิธีการทดสอบ ดังนี้

1.4.2.1 Quality index method (QIM) ตามวิธีการทดสอบของ Vaz-Piras และ Seixas (2006) โดยเกณฑ์การประเมินและแบบการประเมิน ดังภาคผนวก ฉ 1-3

1.4.2.2 การทดสอบคุณภาพโดยรวม ตามวิธีการทดสอบของ Lawless และ Heymann (1999) โดยพิจารณา สี ลักษณะปรากฏ กลิ่นและเนื้อสัมผัส ทั้งส่วนหัวและส่วนลำตัวของหมึกทั้งสองสายพันธุ์

1.5 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพทางตรงและทางอ้อม

นำข้อมูลทางการตรวจสอบคุณภาพประสาทสัมผัสทั้ง 2 วิธี กับการตรวจสอบคุณภาพทางเคมี และการตรวจสอบทางกายภาพมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยคัดเลือกปัจจัยคุณภาพที่มีค่า r สูงสุด (มีค่าเข้าใกล้ 1) เพื่อใช้เป็นดัชนีคุณภาพที่บ่งบอกความสดของหมึกที่เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง และสามารถกำหนดอายุการเก็บรักษาโดยพิจารณาคะแนนจากการทดสอบคุณภาพโดยรวมที่ต่ำกว่า 6 (unacceptable) จากนั้นนำค่าปัจจัยคุณภาพดังกล่าวมาแสดงกราฟความสัมพันธ์ พร้อมทั้งแสดงสมการทางคณิตศาสตร์สำหรับทำนายค่าคุณภาพดังกล่าวตลอดจนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกราฟตามวิธีของ Rees (1995) (ดังแสดงวิธีคำนวณในภาคผนวก ซ)

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนและโครงสร้างจุลภาคของเนื้อหมึกระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง

นำหมึกที่เก็บรักษาเช่นเดียวกับข้อ 1 ทำการวิเคราะห์คุณภาพ ในวันที่ 0 และทุกๆ 4 วันจนกระทั่งมีคุณภาพอยู่ในระดับที่ไม่ยอมรับทางประสาทสัมผัส โดยวิธีการทดสอบคุณภาพโดยรวม (คะแนนระดับ 1 (reject)) ดังนี้

2.1 การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

- การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนไมโอไฟบริลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) (ดังแสดงในภาคผนวก ก7)

- การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของกล้ามเนื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ตามวิธีของ Dublán-Garcia และคณะ (2006) โดยนำตัวอย่างเนื้อส่วนลำตัวทั้งด้านหน้าและหลัง อย่างละ 2 ชิ้น เพื่อดูลักษณะเส้นใยกล้ามเนื้อในแนวตัดขวางของส่วนลำตัว (ดังแสดงในภาคผนวก ค)

2.2 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

แบ่งหมึกเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นหมึกสด และส่วนที่ 2 นำมาต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยให้ส่วนลำตัวมีอุณหภูมิจุดกึ่งกลางขึ้น 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำผสมน้ำแข็ง และวัดค่าแรงเคี้ยวด้วยเครื่อง Texture Analyzer รุ่น TA-XT2i เช่นเดียวกับข้อ 1.3

2.3 การทดสอบเนื้อสัมผัสโดยวิธีทดสอบทางประสาทสัมผัส

การทดสอบใช้วิธี Multisample Difference Test ตามวิธีการทดสอบของ Meilgaard และคณะ (1999) ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 12 คน ทำการฝึกฝนให้ผู้ทดสอบมีความคุ้นเคยกับตัวอย่างโดยใช้มือสัมผัสความแน่นเนื้อของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บรักษาในวันต่างๆ และสังเกตลักษณะที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษา เช่น ความยืดหยุ่น ความแน่นแข็ง และความอ่อนนุ่ม เป็นต้น (ดังแสดงในภาคผนวก ฉ5)

3. การศึกษาปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นดัชนีความสดของหมึกกล้วย และหมึกกระดองที่เก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง

นำหมึกที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายคลอรีนเข้มข้น 50 ppm จากนั้นบรรจุในภาชนะอะลูมิเนียมขนาด 26x34x7 เซนติเมตร และเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3

จนเต็มถาด โดยแบ่งหมึกทั้งสองสายพันธุ์เป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ทำการแช่เยือกแข็งโดยวิธีแบบลมเย็น (Air-blast) ที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 ทำการแช่เยือกแข็งโดยวิธีแผ่นสัมผัส (Contact plate) แบบแนวนอน ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส โดยจะทำการบันทึกอุณหภูมิขณะแช่เยือกแข็ง และเวลาที่ใช้ในการแช่เยือกแข็งจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาหาอัตราการแช่เยือกแข็งของแต่ละวิธี (ดังแสดงในภาคผนวก ข) จากนั้นบรรจุใส่ถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีนและเก็บรักษาทั้งสองส่วนไว้ที่อุณหภูมิ -18 ± 1.3 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยนำตัวอย่างหลังแช่เยือกแข็งและตัวอย่างเก็บรักษาทุกๆ 1 เดือน มาทำการละลายโดยให้น้ำประปาไหลผ่านจนเนื้อหมึกมีอุณหภูมิ 0-2 องศาเซลเซียส เก็บรักษาตัวอย่างไว้ในน้ำแข็งจนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ คุณภาพทางด้านต่างๆ ของเนื้อหมึกในส่วนลำตัว ดังนี้

3.1 การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

โดยนำตัวอย่างส่วนลำตัวของหมึกทั้งสองชนิดที่เก็บรักษาทำการลอกหนังและนำมาวิเคราะห์ค่าดังนี้

- pH ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ เช่นเดียวกับ 1.1
- Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) โดยวิธีการทดสอบของ Buege และ Aust (1978) (ดังแสดงในภาคผนวก ก3)
- ฟอรั่มัลดีไฮด์อิสระ (free formaldehyde) ตามวิธีการทดสอบของ Nash (1953) (ดังแสดงในภาคผนวก ก2)
- การละลายของโปรตีน (protein solubility) โดยดัดแปลงวิธีวิธีการทดสอบของ Chawla และ คณะ (1996) (ดังแสดงในภาคผนวก ข)

3.2 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของกล้ามเนื้อ ด้วย SEM เช่นเดียวกับ 2.1 (โดยจะทำการตรวจสอบทุก 2 เดือน)
- แรงเหนียวด้วยเครื่อง Texture Analyzer รุ่น TA-XT2i ตามวิธีการทดลองของ Dublán- Garcia และคณะ (2005) โดยใช้ Warner-Blatzler Blade เช่นเดียวกับข้อ 1.3
- ค่าสี โดยระบบ $L^*a^*b^*$ ด้วยเครื่อง Hunter Lab โดยวัดส่วนของลำตัวด้านหลัง ที่ทำการลอกหนังโดยสุ่มตำแหน่งที่วัดค่า 5 จุด
- Expressible drip ตามวิธีการทดสอบของ Hasegawa (1987) เช่นเดียวกับ 1.3
- Free drip ตามวิธีการทดสอบของ Hasegawa (1987) (ดังแสดงในภาคผนวก ง1)
- Cooking loss ตามวิธีของ Jatuphong และคณะ (2000) (ดังแสดงในภาคผนวก ง2)

3.3 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส

ทำการตรวจสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.4 จากนั้นนำข้อมูลทางการตรวจสอบคุณภาพประสาทสัมผัสทั้ง 2 วิธีกับการตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ ทางเคมี และการตรวจสอบทางกายภาพมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เช่นเดียวกับข้อ 1.5

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลทางด้านสถิติ ซึ่งจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตัวอย่างสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสกับค่าคุณภาพด้านอื่นๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window Ver. 10.0

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นดัชนีความสดของหมึกกล้วย และหมึกกระดองที่เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง

1.1 การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

1.1.1 การเปลี่ยนแปลงของค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก

ค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกของหมึกกล้วยและหมึกกระดองในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งแสดงดัง Figure 9 ค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกของหมึกกล้วยมีค่าสูงกว่าหมึกกระดอง โดยมีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 และ 0.2 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งอาจจะเกิดจากความแตกต่างขององค์ประกอบโปรตีนในแต่ละสายพันธุ์ โดย Ruiz-Capillas และคณะ (2002) พบว่าปริมาณของกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในสัตว์น้ำมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ จาก Figure 9 พบว่าค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกของหมึกทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นตลอดอายุการเก็บรักษา 16 วัน ($p < 0.01$) ซึ่งเกิดจากการไฮโดรไลซิสของพันธะเพปไทด์ในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง นอกจากนี้ค่าดังกล่าวที่พบในหมึกกล้วยเพิ่มขึ้นสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหมึกกระดอง แสดงว่าหมึกกล้วยมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสและมีจำนวนของจุลินทรีย์ที่สูงกว่า (แสดงดัง Figure 12) จึงส่งผลให้มีการย่อยสลายของโปรตีนที่สูงกว่า โดยหลังการตายของ cephalopods จะมีการย่อยสลายของโปรตีนอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ภายในกล้ามเนื้อและจากจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงทำให้ระดับไนโตรเจนจากกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น มีผลช่วยให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียเจริญและมีการนำเสียอย่างรวดเร็ว (Vaz-Pires and Barbosa, 2004) Hurtado และคณะ (1999) พบว่าสาเหตุสำคัญของ การย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อของหมึกสายเกิดจากเอนไซม์โปรตีนเอส และมีกิจกรรมการย่อยสลายสูงกว่าที่พบในปลาสายพันธุ์ต่างๆ ผลที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาในกุ้งขาว (white shrimp) กุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp) (Sriket *et al.*, 2007) และปลาปากคม (Lizard fish) (Benjakul *et al.*, 2003) ซึ่งพบว่าปริมาณเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกและกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น รวมทั้งในหมึกกล้วย (*Loligo plei*) (Lapa-Guimarães *et al.*, 2005) ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนและปริมาณไนโตรเจนของกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid nitrogen, FAA-N) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็งเนื่องมาจากเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนภายในกล้ามเนื้อหรือจากจุลินทรีย์

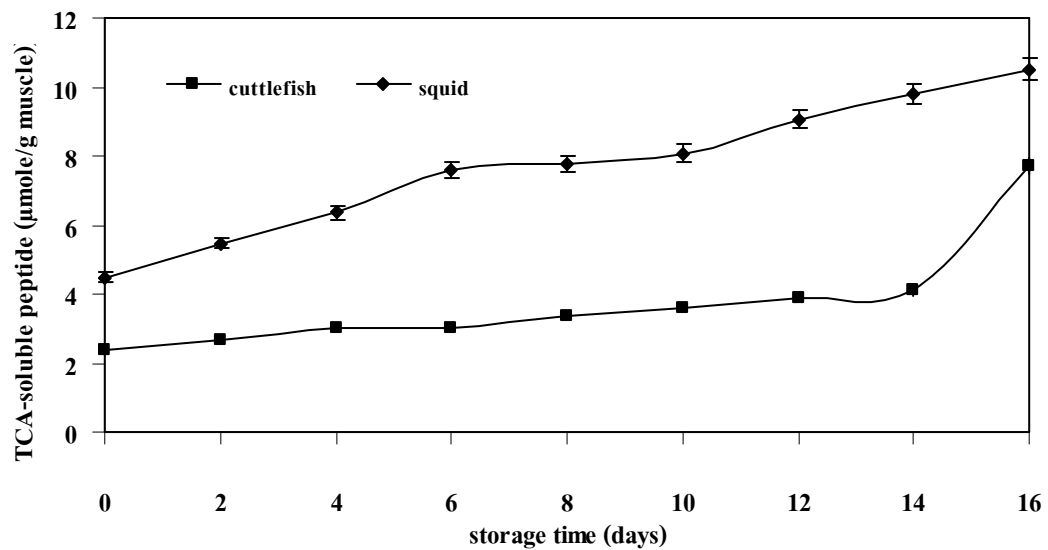


Figure 9. Changes in TCA-soluble peptides of deskinmed squid and cuttlefish during iced storage.

Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

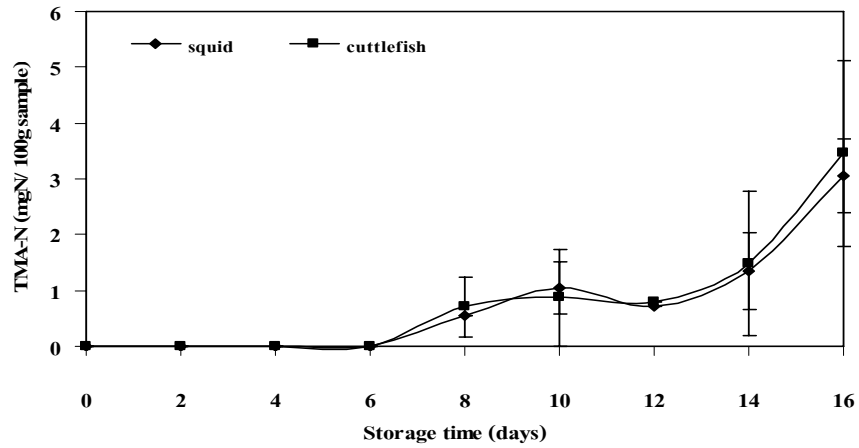
1.1.2 การเปลี่ยนแปลงของไตรเมทิลเอมีนในโตรเจน ปริมาณของด่างที่ระเหยทั้งหมด และ แอมโมเนีย

การเปลี่ยนแปลงของไตรเมทิลเอมีนในโตรเจน (trimethylamine nitrogen, TMA-N) ปริมาณของด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile basic nitrogen, TVB-N) และแอมโมเนียของ หมึกกล้วยและหมึกกระดองในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 16 วัน แสดงดัง Figure 10 (a, b และ c) พบว่าปริมาณของ TMA-N ในหมึกกล้วยและหมึกกระดองมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 6 วัน และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ($p < 0.05$) โดยมีค่าเพิ่มมากกว่า 1 มิลลิกรัมหลังจากวันที่ 10 และ 12 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Lapa-Guimarães และคณะ (2005) ที่พบว่า ปริมาณของไตรเมทิลเอมีน (TMA) ในหมึกกล้วย (*Loligo plei*) จะเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 12 ของการเก็บรักษา Stanley และ Hultin (1982); Iida และคณะ (1992); Ruiz-Capillas และคณะ (2002) พบว่า TMA-N ของ cephalopods ที่วิเคราะห์ทันทีหลังจากการจับมีค่าเท่ากับหรือต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ซึ่งระดับดังกล่าวสามารถบ่งชี้ถึงความสดของ cephalopods ได้ นอกจากนี้ปริมาณของ TMA-N จะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของตัวอย่างที่ทำการศึกษา เช่น ถิ่นที่อยู่อาศัย เพศ ช่วงอายุ เป็นต้น (Ruiz-Capillas *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตาม TMA-N มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 12 วัน ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ในโตรเจน (TMAO-N) ไปเป็น TMA โดยเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์รีดักเตสจากจุลินทรีย์ที่

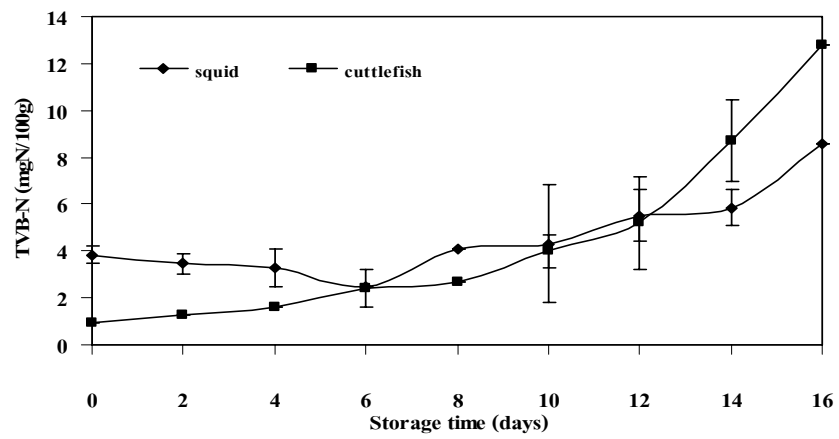
ชอบอนุมิต้าในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง ซึ่ง TMA ที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดกลิ่นและกลิ่นรสที่ผิดปกติ (Gram and Huss, 1996) การเปลี่ยนแปลงของ TMA มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่ชอบอนุมิต้า ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเน่าเสียของหมึกกล้วยและหมึกกระดองเกิดจากจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมรีดิวซ์ไนโตรเจนที่ปล่อยออกมา (TMA-O) สูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

ปริมาณของด่างทั้งหมดที่ระเหยได้ของหมึกกล้วยเพิ่มขึ้นหลังจากเก็บรักษาในน้ำแข็ง เป็นเวลา 6 วัน ($p < 0.05$) ขณะที่หมึกกระดองเพิ่มขึ้นตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษาและจะเพิ่มชัดเจนหลังจาก 12 วัน ($p < 0.05$) ปริมาณด่างที่ระเหยได้สามารถใช้เป็นอินดิเคเตอร์ของการเสื่อมเสียมากกว่าที่จะใช้เป็นดัชนีความสด (Yamanaka *et al.*, 1987; Ohashi *et al.*, 1991; Civera *et al.*, 1999; Lapa-Guimarães *et al.*, 2005) เมื่อพิจารณาจากค่า TMA-N และ TVB-N จะเห็นว่าหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 16 วัน ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ผู้บริโภคยอมรับได้โดยมีค่าปริมาณ TMA-N เท่ากับ 3.30 และ 3.46 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และ TVB-N เท่ากับ 8.57 และ 12.77 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ TMA ของปลาและพวกสัตว์น้ำจำพวกมีเปลือก (shellfish) เช่น หอย กุ้ง ปู จะจำกัดระดับไม่เกิน 5 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อ 100 กรัม (Hebard *et al.*, 1982) Ke และคณะ (1984) ได้เสนอการจัดระดับคุณภาพของ cephalopod ตามปริมาณ TVB-N โดยปริมาณที่สูงกว่า 45 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง จัดอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่สามารถยอมรับได้ ขณะที่ในตลาดประเทศญี่ปุ่นจัดเกณฑ์ปริมาณ TVB-N ที่ค่าเพียง 15 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง (Ruiz-Capillas *et al.*, 2002)

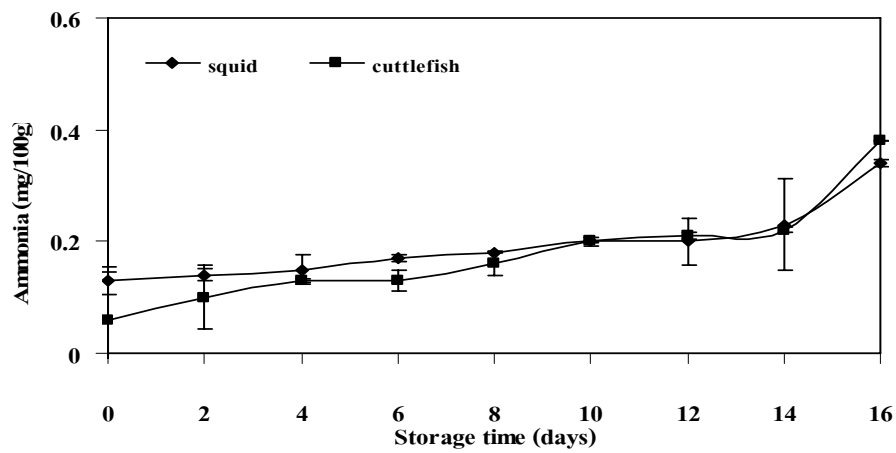
Figure 10a แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอมโมเนียของทั้งสองตัวอย่างเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากวันที่ 14 ของการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Licciardello และคณะ (1985) อ้างโดย Paarup *et al.*, (2002) และ Paarup และคณะ (2002) ซึ่งพบว่าแอมโมเนียในหมึกกล้วย *Loligo pealei* และ *Todaropsis eblanae* มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็ง และเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษา ผลที่ได้สอดคล้องในทิศทางเดียวกับค่า TVB-N (Figure 10b) โดย TVB-N ประกอบด้วย TMA DMA และแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ของสัตว์น้ำ (Okuzumi and Fuji, 2000) Lapa-Guimarães และคณะ (2005) รายงานว่า หมึกกล้วยทางการค้ามีปริมาณแอมโมเนีย 17.1 มิลลิกรัมของแอมโมเนียในโตรเจนต่อ 100 กรัม คิดเป็นร้อยละ 88.6 ของปริมาณ TVB-N และ Leblanc และ Gill (1984) รายงานว่า แอมโมเนียสามารถใช้เป็นดัชนีคุณภาพที่ดีสำหรับหมึกกล้วย (*Illex illecebrosus*)



(a)



(b)



(c)

Figure 10. Changes in trimethylamine nitrogen (TMA-N) (a) total volatile based nitrogen (TVB-N) (b) and ammonia (c) in deskinning squid and cuttlefish during iced storage. Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

1.1.3 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช

การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชแสดงดัง Figure 11 จะเห็นว่าค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในระหว่างการเก็บรักษาโดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Ohashi และคณะ (1991) ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชของหมึกกล้วย (common squid) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียสค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วงแรกที่เก็บรักษา ขณะที่ค่าพีเอชของตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสมีค่าคงที่ Ramirez-Suarez และคณะ (2008) พบว่าหมึกกล้วย (*Dosidicus gigas*) ที่เก็บรักษาที่ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วันมีค่าพีเอชคงที่เช่นกัน Ando และคณะ (1999) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระยะหลังการเกร็งตัวของหมึกกล้วย (*Loligo bleekeri*) ชัดเจน ทั้งนี้ อาจเกิดจากองค์ประกอบบางชนิดในกล้ามเนื้อหมึกที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ ได้แก่ TMA-O โดยในหมึกจะมีปริมาณสูงถึง 75-250 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อ 100 กรัม (สุทธวิวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

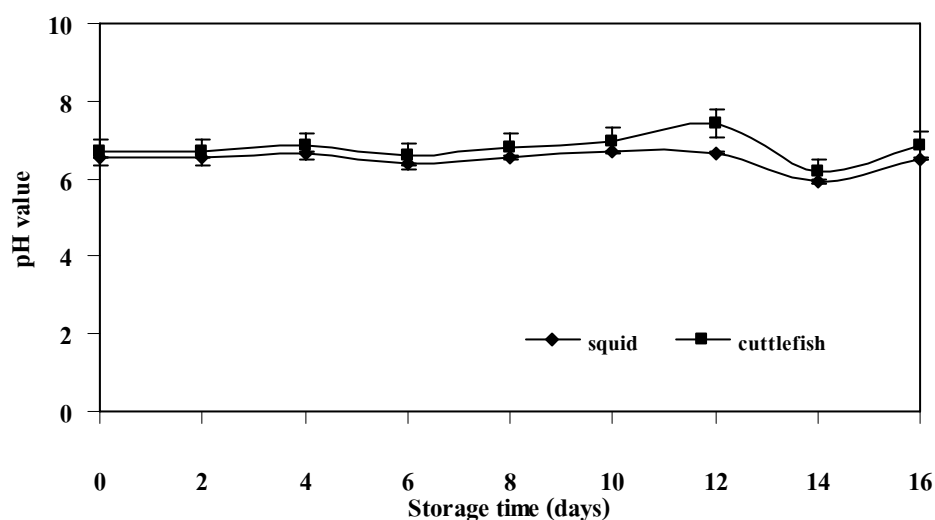


Figure 11. Changes in pH from squid and cuttlefish during iced storage.

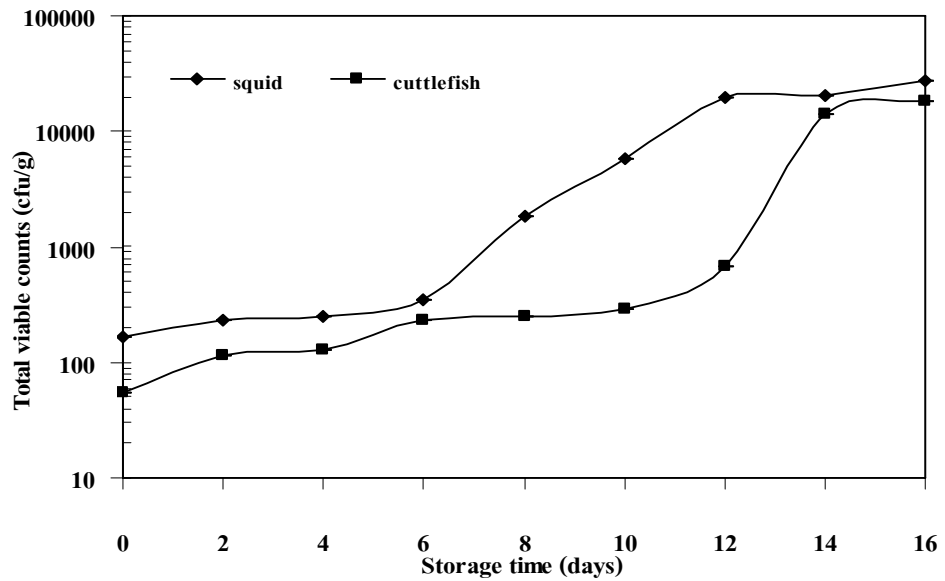
Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

1.2 การวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์

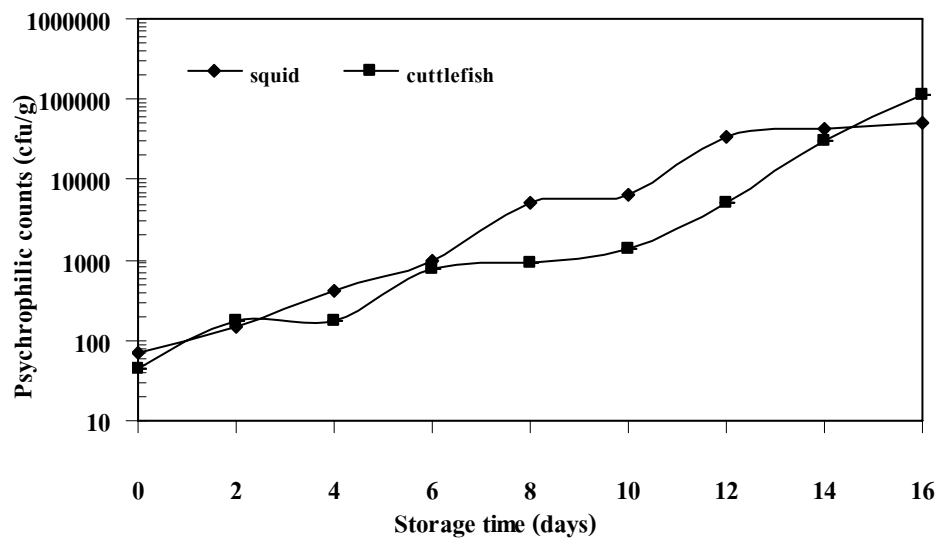
1.2.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำแสดงดัง Figure 12 (a และ b) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของหมึกกล้วยและหมึกกระดองเพิ่มขึ้นจาก 1.7×10^2 cfu ต่อกรัม และ 1.1×10^2 cfu ต่อกรัม ในช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษา ไปเป็น 2.8×10^4 cfu ต่อกรัม และ 1.8×10^4 cfu ต่อกรัม ในวันที่ 16 ตามลำดับ (Figure 12a) จำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำในหมึกกล้วยและหมึกกระดองเพิ่มขึ้นจาก 7.0×10^1 cfu ต่อกรัม และ 4.5×10^1 cfu ต่อกรัม ในวันที่ 0

ของการเก็บรักษาเพิ่มเป็น 5.2×10^4 cfu ต่อกรัม และ 1.1×10^5 cfu ต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 16 วัน (Figure 12b) จาก Figure 12 จะเห็นว่าปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำในหมึกทั้งสองชนิดอยู่ในช่วง 10^4 - 10^5 cfu ต่อกรัม หลังจากเก็บรักษา 16 วัน เมื่อพิจารณาจุดไม่ยอมรับทางประสาทสัมผัส (Figure 15) พบว่าหมึกกล้วยและหมึกกระดองมีอายุการเก็บรักษาที่ 6 วัน และมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำเพียง 2.3×10^2 cfu ต่อกรัม และ 2.5×10^2 cfu ต่อกรัม ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Vaz-Pires และ Barbosa (2004) ที่พบว่าหมึกสาย (*Octopus vulgaris*) ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 8 วัน ซึ่งอยู่ในระดับที่ปฏิเสธทางประสาทสัมผัส มีปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมด 10^5 - 10^6 cfu ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมีน้อยกว่าในปลาที่เสื่อมเสีย (Hurtado *et al.*, 1999; Vaz-Pires and Barbosa, 2004) และอยู่ในระดับที่ปฏิเสธ (rejection) โดยทั่วไปมีจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียอยู่ในช่วง 10^7 - 10^9 cfu ต่อกรัม (Huss *et al.*, 1997; Olafsdóttir *et al.*, 1997; Vaz-Pires and Barbosa, 2004) นอกจากนี้ให้ผลสอดคล้องกับ cephalopod ชนิดอื่นๆ เช่น หมึกกล้วย (*Loligo plei*) (Lapa-Guimarães *et al.*, 2005) และหมึกสาย (*Octopus vulgaris*) (Vaz-Pires and Barbosa, 2004)



(a)



(b)

Figure 12. Changes in total viable count (a) and psychrophilic counts (b) of squid and cuttlefish during iced storage.

Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

1.3 การวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ

1.3.1 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ

การเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บรักษาในน้ำแข็งแสดงดัง Figure 13 ค่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อของหมึกทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ค่าที่เพิ่มสูงขึ้นนั้นบ่งบอกถึงการสูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำของกล้ามเนื้อในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งอาจเกิดการย่อยสลายของโปรตีนบางส่วนที่เกิดจากการย่อยสลายตัวเอง อาจส่งเสริมต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ทำให้หมู่น้ำของโปรตีนออกสู่ภายนอกมากขึ้นและเกิดการเสียสภาพ ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำในโครงสร้างกล้ามเนื้อ (Sriket, 2007) นอกจากนี้ความสามารถในการอุ้มน้ำของกล้ามเนื้อยังสัมพันธ์กับโครงข่ายไมโอไฟบริล รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษา โดยส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในเนื้อสด (Tsuchiya *et al.*, 1978; Zayas, 1997; Dublan-Garcia *et al.*, 2005)

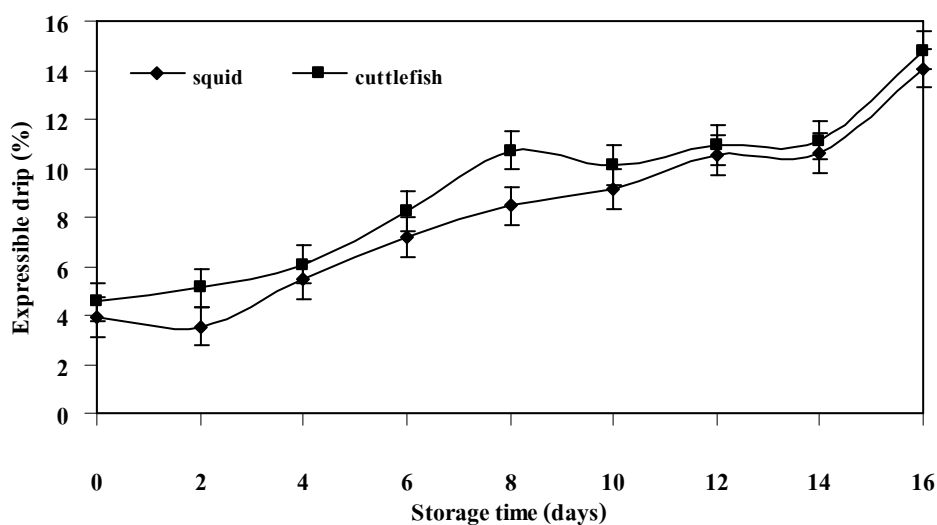


Figure 13. Changes in expressible drip of deskinning squid and cuttlefish during iced storage.

Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

1.3.2 การเปลี่ยนแปลงของค่าแรงเนียน

ค่าแรงเนียนของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บรักษาในน้ำแข็งแสดงดัง Figure 14 หมึกทั้งสองชนิดมีค่าแรงเนียนลดลงอย่างช้าๆ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ค่าแรงเนียนของหมึกกระดองสูงกว่าหมึกกล้วย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเนื้อของหมึกกระดองมีความหนาแน่นกว่าหมึกกล้วย Ochiai และคณะ (1985); Sato และคณะ (1986); Hatae และคณะ (1986); Olaechea และ

คณะ (1993); Ando และคณะ (1999) รายงานว่า ความแน่นเนื้อของกล้ามเนื้อสัตว์น้ำมีความสัมพันธ์กับคอลลาเจนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก (Figure 9) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากล้ามเนื้อหมึกกล้วยและหมึกกระดองมีเนื้อสัมผัสนุ่มลง เนื่องจากการย่อยสลายของกล้ามเนื้อ โปรตีนและการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยกล้ามเนื้อ (Rodger *et al.*, 1984; Nagashima *et al.*, 1992; Dublan-Garcia *et al.*, 2005)

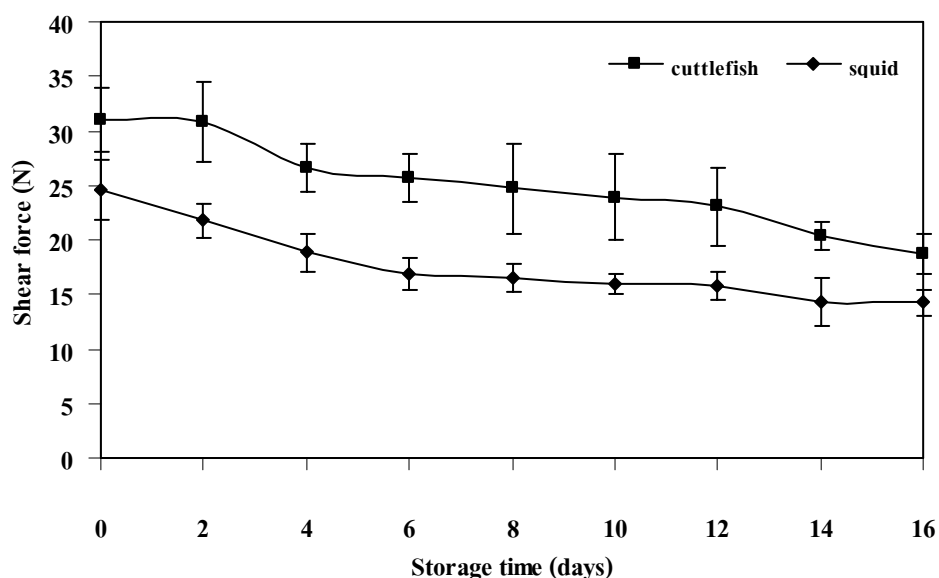


Figure 14. Change in shear force of deskinning squid and cuttlefish during iced storage.

Bars represent the standard deviation from five determinations.

1.3.3 การเปลี่ยนแปลงค่าสี

Table 9 และ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า L^* , a^* และ b^* ของลำตัวหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่ทำการลอกหนัง พบว่าค่า L^* ซึ่งแสดงค่าความสว่างของหมึกทั้งสองชนิดมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา ขณะที่ค่า a^* แสดงค่าสีแดง-สีเขียว เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และมีค่าสูงขึ้นอย่างมากในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ค่า b^* ซึ่งแสดงค่าสีเหลือง-สีน้ำเงินในหมึกกล้วยมีแนวโน้มลดลง ขณะที่หมึกกระดองมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ค่า a^* ของหมึกกล้วยมีค่าสูงกว่าหมึกกระดอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเนื้อหมึกกล้วยมีการติดสีแดงเพิ่มขึ้น ขณะที่เนื้อหมึกกระดองเปลี่ยนเป็นสีเหลืองในระหว่างการเก็บรักษา Lapa-Guimarães และคณะ (2002) พบว่าหมึกกล้วย (*Loligo plei*) ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งมีความเข้มของสีแดงและสีเหลืองที่บริเวณลำตัวเพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษา การลดลงของความขาวและการเกิดสีแดงสามารถ

บ่งบอกถึงคุณภาพของหมึกกล้วยที่ลดลง (Ke *et al.*, 1984; Hincks and Stanley, 1985; Lakshmanan *et al.*, 1993; Lapa-Guimarães *et al.*, 2002) โดยหมึกกล้วยเริ่มเปลี่ยนเป็นสีชมพู หลังเก็บรักษาในน้ำแข็ง 4 วัน และมีการย้อมติดสีแดงเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากเก็บรักษา 16 วัน อาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเนื้อหมึกและจากจุลินทรีย์บนผิวหนัง สามารถย่อยสลายเม็ดสีที่อยู่บนผิวหนังแล้วปลดปล่อยเม็ดสีให้ย้อมติดบนลำตัวของหมึกกล้วย (Lapa-Guimarães *et al.*, 2002; Vaz-Pires *et al.*, 2008) ซึ่งผิวหนังของหมึกประกอบด้วยเม็ดสี เช่น สีดำ สีแดง หรือสีเหลือง เม็ดสีเหล่านี้จะกระจายอยู่ทั่วไป ทั้งส่วนลำตัว หัว และครีบของหมึก สามารถขยายหรือหดตัวได้ โดยการควบคุมของระบบประสาท ภายหลังจากการตายเส้นประสาทจะหยุดทำงานทำให้จุดสีขยายใหญ่ขึ้น ประกอบกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมด (Figure 10b) มีผลทำให้เม็ดสีเปลี่ยนเป็นสีแดงปนม่วงในระหว่างการเก็บรักษา (Hanabe *et al.*, 1989; สุททวิชาน์ เเบญจกุล, 2548)

Table 9. Changes in L*, a* and b* of deskinning squid during iced storage.

Storage time (days)	L*	a*	b*
0	74.37±5.30 ^a	0.07±0.58 ^d	10.22±0.68 ^a
2	71.48±1.05 ^{ab}	0.90±0.88 ^{cd}	8.49±2.13 ^{ab}
4	66.65±2.05 ^{cd}	4.09±1.47 ^b	8.25±4.48 ^{ab}
6	69.25±2.41 ^{bc}	2.47±1.80 ^{bc}	5.82±2.46 ^{bc}
8	70.34±5.44 ^{abc}	2.35±0.62 ^{bc}	3.53±1.25 ^d
10	64.15±4.25 ^d	2.69±1.46 ^{bc}	3.07±1.14 ^d
12	72.12±2.81 ^{ab}	2.96±1.31 ^{bc}	5.02±2.27 ^{bc}
14	70.16±1.84 ^{abc}	3.45±1.19 ^b	5.51±1.87 ^{bc}
16	65.61±2.10 ^{bc}	8.46±1.57 ^a	5.78±2.37 ^{bc}

Note: Mean ± SD from five determinations.

Different letters within the same column indicate significant differences (p<0.05).

Table 10. Changes in L*, a* and b* of deskinning cuttlefish during iced storage.

Storage time (days)	L*	a*	b*
0	78.86±3.78 ^{bc}	-2.32±0.53 ^c	7.32±1.16 ^b
2	76.06±1.41 ^{cd}	-1.75±0.35 ^{bc}	3.67±0.84 ^d
4	81.75±1.38 ^{ab}	-0.99±0.27 ^b	7.21±0.95 ^b
6	80.99±1.60 ^{ab}	-1.44±0.28 ^{bc}	7.67±0.55 ^{ab}
8	83.80±0.75 ^a	-1.86±0.49 ^{bc}	7.24±0.57 ^b
10	70.99±2.21 ^c	-1.49±0.55 ^{bc}	3.13±0.69 ^d
12	80.88±2.40 ^{ab}	-1.45±0.80 ^{bc}	5.62±1.87 ^c
14	81.84±1.53 ^{ab}	-1.20±0.57 ^b	5.30±0.70 ^c
16	73.47±3.11 ^{dc}	1.11±1.44 ^a	9.01±1.44 ^a

Note: Mean ± SD from five determinations.

Different letters within the same column indicate significant differences (p<0.05).

1.4 การเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัส

1.4.1 การเปลี่ยนแปลงของ QIM

Figure 15 และ 16 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ของดัชนีคุณภาพสำหรับหมึกกล้วยและหมึกกระดองกับระยะเวลาการเก็บรักษา ตามลำดับ กราฟดังกล่าวมีความสัมพันธ์แบบเอ็กโพเนนเชียล ซึ่งมีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2) เท่ากับ 0.975 และ 0.971 สำหรับหมึกกล้วยและหมึกกระดอง ตามลำดับ ขณะที่ QIM ของหมึกสาย (*Octopus vulgaris*) (Lapa-Guimarães *et al.*, 2004) หมึกกล้วย (*Illex coindetii*) และหมึกกระดอง (*Sepia officinalis*) (Vaz-Pires and Seixas, 2006) แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 0.99 ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนั้นคงเกิดจากความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ cephalopod แต่ละชนิด โดย Lutén และ Martinsdóttir (1997) อ้างโดย Vaz-Pires and Seixas (2006) กล่าวว่า คะแนนของ QIM เป็นคะแนนรวมของคุณภาพทางประสาทสัมผัสจะต้องมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับระยะเวลาการเก็บรักษา น้ำแข็ง และสามารถใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Dalgaard (2000) อ้างโดย Barbosa and Vaz-Pires (2004) กล่าวว่า ความชื้นของคะแนน QIM สามารถสร้างเป็นสมการทาง

คณิตศาสตร์เพื่อใช้ทำนายอายุการเก็บรักษาสำหรับผลของอุณหภูมิมีต่ออายุของผลิตภัณฑ์ และยังสามารถบอกถึงระยะเวลาที่เหลือที่ยังคงเก็บรักษาในน้ำแข็งได้ โดยการลบจำนวนวันที่เก็บรักษากับระยะเวลาทั้งหมดที่เก็บรักษาจนกระทั่งปฏิกิริยา แต่สำหรับการทดลองนี้ ได้นำ QIM ที่ใช้การตรวจสอบความสดของหมึกกล้วย (*Illex coindetii*) (Vaz-Pires and Seixas, 2006) และหมึกกระดอง (*Sepia officinalis*) (Vaz-Pires and Seixas, 2006) มาใช้จึงทำให้กราฟคะแนนที่ได้ไม่เป็นเส้นตรง หากต้องการนำ QIM มาใช้สำหรับทำนายอายุการเก็บรักษาของหมึกกล้วย (*Photololigo duvaucelii*) และหมึกกระดอง (*Sepia aculeata*) ที่ใช้ในการวิจัยนี้จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในการปรับพารามิเตอร์ที่ไม่บ่งชี้คุณภาพของหมึกทั้งสองชนิดให้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของหมึกดังกล่าว เช่น การติดกันของกระดุกและหัวของหมึกกระดอง หรือการเพิ่มพารามิเตอร์ที่จำเป็นในการตรวจสอบ เช่น ความสมบูรณ์ของผิวหนัง และการย้อมติดสีบนกล้ามเนื้อ เป็นต้น Figure 15 และ 16 แสดงให้เห็นว่าคะแนน QIM ของหมึกทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษา ($p < 0.05$) โดยคะแนน QIM เน้นพิจารณาลักษณะปรากฏและกลิ่น เนื่องจากเป็นพารามิเตอร์สำคัญที่มีผลต่อการขายและการบริโภคหมึกของตลาดโลก (Vaz-Pires and Barbosa, 2006) ในวันที่ 0 ผิวหนังของหมึกกล้วยมีลักษณะเหลือบเหมือนสีรุ้ง มีกลิ่นสาหร่าย ส่วนหมึกกระดองในวันที่ 0 โดยปกติลักษณะสีดำของผิวหนังจะสูญเสียทันที เนื่องจากการคลายตัวของเม็ดสีหลังจากการตายซึ่งทำให้ค่าคะแนนเท่ากับ 0 ไม่ได้เป็นระดับคุณภาพที่ดีที่สุดตามทฤษฎี ความแตกต่างที่พบระหว่างหมึกกล้วยและหมึกกระดองเกิดจากปัจจัยทางชีววิทยาและสรีระวิทยา (Vaz-Pires and Barbosa, 2006) หลังจากวันที่ 6 ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ตัวอย่างอยู่ในระดับคะแนนไม่ยอมรับ คะแนน QIM ของหมึกกล้วยและหมึกกระดองเท่ากับ 10.8 และ 11.3 ตามลำดับ พบว่ามีกลิ่นคาวเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ผิวหนังหมึกกล้วยเป็นสีชมพู หมึกกระดองตรงกลางลำตัวที่ลอกหนังแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นอกจากนี้หมึกทั้งสองชนิด มีเนื้อสัมผัสนุ่มลงและตามีลักษณะนุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ยังสด หมึกกล้วยและหมึกกระดองมีคะแนนระดับปฏิกิริยา (QIM = 13.7 และ 14.8 คะแนนตามลำดับ) ในวันที่ 14 ซึ่งพบว่าผิวหนังจะเกิดสีชมพูเข้ม มีกลิ่นเน่าเสียที่รุนแรงและมีเนื้อสัมผัสนุ่มมากในหมึกทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามคะแนน QIM ของหมึกทั้งสองชนิดมีค่าต่ำกว่าคะแนนสูงสุด (14 และ 16 ตามลำดับ) ทั้งนี้เนื่องจากคุณลักษณะที่ใช้ประเมิน QIM ไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของหมึกที่ศึกษาดังที่กล่าวมาแล้ว Lapa-Guimarães และคณะ (2002) รายงานว่า หมึกกล้วย (*Loligo plei*) คุณภาพที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังจาก 7 วันของการเก็บรักษา โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงสีที่ผิวหนัง เช่นเดียวกับ Civera และคณะ (1999); Lapa-Guimarães และคณะ (2002) พบว่าคุณภาพทางประสาทสัมผัสของหมึกกระดอง (*Sepia officinalis*) หมึกสาย (*Eledone moschata*) และหมึกกล้วย (*Illex coindetii*) ลดลงหลังจาก 7 วันของการเก็บรักษาที่ 1-2 องศาเซลเซียส และลักษณะทางประสาท

สัมผัสถึงระดับที่ไม่สามารถบริโภคได้หลังจากวันที่ 10 นอกจากนี้ Yamanaka และคณะ (1987); Lapa-Guimarães และคณะ (2002) พบว่ากล้ามเนื้อของหมึก *Todarodes pacificus* ที่เก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน มีลักษณะที่ไม่มีกลิ่นและเนื้อสัมผัสแน่นและสามารถจัดอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ แต่หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 10 วันพบว่ามีกลิ่นเหม็นเน่า และเนื้อสัมผัสนุ่มมาก Vaz-Pires และ Seixas (2006) รายงานว่าหมึกกระดอง (*Sepia officinalis*) และหมึกกล้วย (*Illex coindetii*) มีคะแนน QIM ระดับปฏิเสธของพารามิเตอร์ทั้งหมด 17 และ 16 คะแนน หลังการเก็บรักษา 10 วันและ 9 วัน ตามลำดับ อายุการเก็บรักษาของพวก cephalopods จะสั้นกว่าพวกปลาที่เก็บในอุณหภูมิและสภาวะเดียวกัน เนื่องจากทางสรีระวิทยาและทางชีววิทยาของพวก cephalopods เช่น ผิวหนังที่ไม่ซับซ้อนและบอบบาง ไม่มีเกล็ด มีลักษณะนุ่มมาก โดยเฉพาะองค์ประกอบทางชีวเคมีทั่วไปของสัตว์กลุ่มนี้ สามารถย่อยสลายได้ง่าย จึงส่งผลให้คุณภาพลดลงอย่างรวดเร็วและเกิดการย่อยสลายตัวเองอย่างมีประสิทธิภาพ (Vaz-Pires and Seixas, 2006)

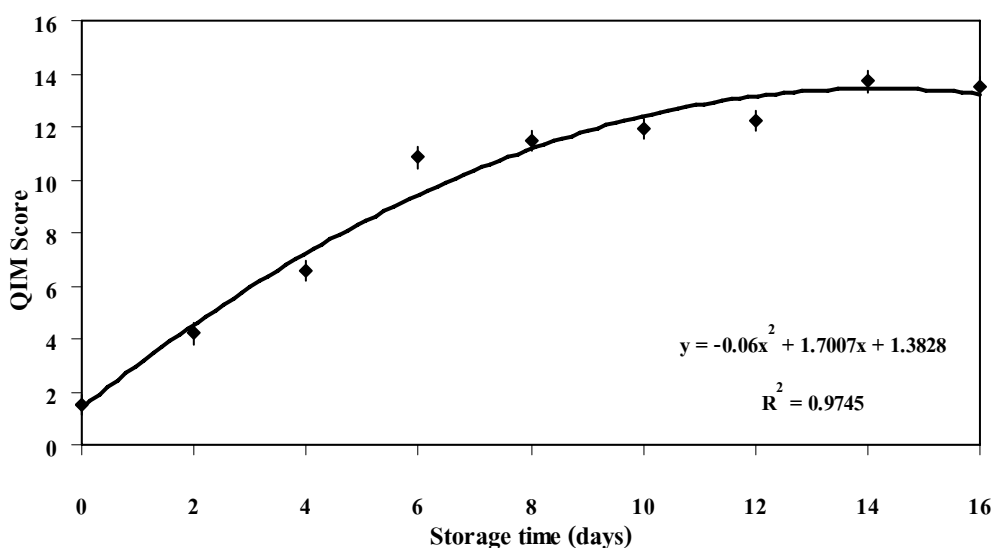


Figure 15. Changes in QIM score of squid during iced storage.

Bars represent the standard deviation from twelve determinations.

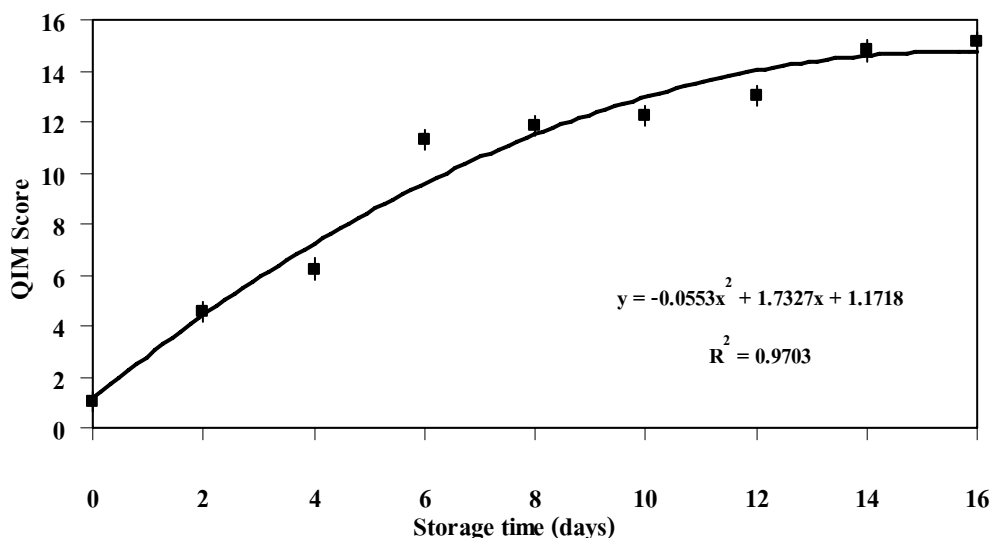


Figure 16. Changes in QIM score of cuttlefish during iced storage.

Bars represent the standard deviation from twelve determinations.

1.4.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพโดยรวม

Figure 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพโดยรวมของหมึกกล้วยและหมึกกระดอง ในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง คะแนนคุณภาพโดยรวมของหมึกทั้งสองชนิดลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยจากการพิจารณาคุณภาพโดยรวมคะแนนที่อยู่ในช่วง 3-5 และ 1-2 แสดงว่า ไม่ยอมรับและปฏิเสธหมึกทั้งสองชนิด ตามลำดับ (Lawless and Heymann, 1998) ดังนั้น หมึกกล้วยและหมึกกระดองจึงมีอายุการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 6 วัน ซึ่งอยู่ในระดับคะแนนที่ผู้บริโภคเริ่มไม่ยอมรับ (4.6 และ 5.1 ตามลำดับ) โดยพบกลิ่นออกซิไดซ์และกลิ่นคาว มีลักษณะผิวแห้งเหี่ยว/ถลอก การเชื่อมต่อระหว่างหัวกับลำตัวหลวม เนื้อสัมผัสและหรือนิ่ม และเกิดจุดสีชมพูบนเนื้อของหมึกกล้วย และบนผิวหนังด้านท้องของหมึกกระดอง หลังจากการเก็บรักษา 14 วัน คุณภาพทางประสาทสัมผัสของหมึกทั้งสองชนิดถึงจุดที่ไม่สามารถบริโภคได้ (จุดปฏิเสธ) เมื่อพบกลิ่นแอมโมเนียหรือกลิ่นเหม็นเน่าในหมึกทั้งสองชนิด

U.S. Food and Drug Administration (US FDA, 2005) ได้อธิบายคุณลักษณะที่บ่งบอกระดับคุณภาพที่ปฏิเสธสำหรับปลา กุ้ง และหอยสดและแช่เยือกแข็ง ได้แก่ กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นยีสต์ กลิ่นหมัก กลิ่นหืน กลิ่นกะหล่ำปลีเน่า กลิ่นแอมโมเนีย กลิ่นอินโดล กลิ่นเหม็นเน่า และกลิ่นคล้ายอุจจาระ จากการศึกษาหมึกกล้วย *Illex illecebrosus* (Ke *et al.*, 1984) และ *Loligo duvacei* (Lakshmanan *et al.*, 1993) พบว่าผิวแห้งของหมึกกล้วยสดจะมีลักษณะที่สดใสและมีสีน้ำตาลแดง หมึกกล้วยที่มีจุดสีแดงเข้มจะเป็นคุณลักษณะที่ไม่ยอมรับ Paarup และคณะ (2002) พบว่า

หมึกกล้วย (*Todaropsis eblanae*) มีระดับคุณภาพที่ปฏิเสธหลังเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 12 วัน เนื่องจากพบกลิ่นแอมโมเนีย และมีอัตราการเกิดแอมโมเนียและไตรเมทิลเอมีนสูง ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของนักวิจัยอื่นๆ เช่น หมึกกล้วย *Todaropsis eblanae* (Paarup *et al.*, 2002) และ *Loligo plei* (Lapa-Guimarães *et al.*, 2005) ซึ่งพบว่าปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษาจนกระทั่งถึงระดับปฏิเสธ ตามรายงานของ Okuzumi และ Fujii (2000) พบว่า TMA DMA และแอมโมเนียมีผลต่อการสูญเสียความสด โดยให้กลิ่นคาว (fishy) และกลิ่นเน่าเสีย (putrid smell)

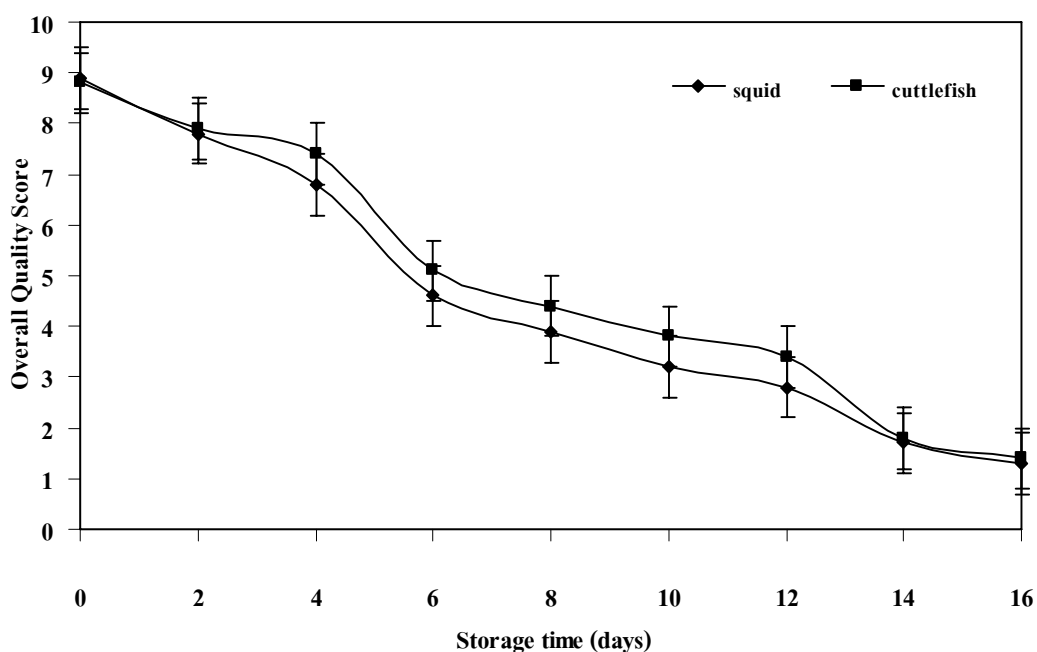


Figure 17. Changes in overall quality score of squid and cuttlefish during iced storage.

Bars represent the standard deviation from twelve determinations.

1.4.3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างผลการทดลองทางด้านประสาทสัมผัส จุลินทรีย์ ภายนอกและเคมีของหมึกกระดองและหมึกกล้วยที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง

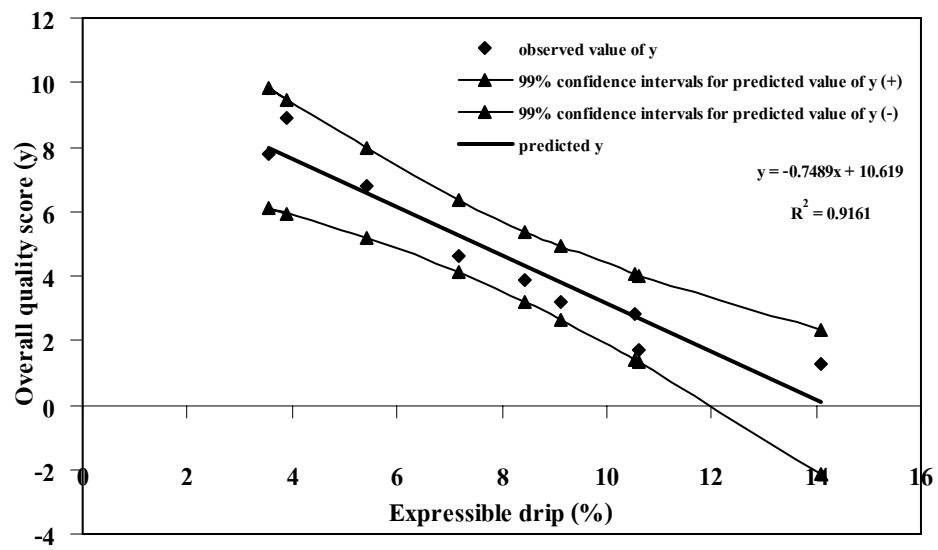
ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างผลการทดสอบคุณภาพโดยตรง ได้แก่ การทดสอบทางจุลินทรีย์ ภายนอกและเคมีกับการทดสอบคุณภาพโดยทางอ้อม ได้แก่ การทดสอบทางประสาทสัมผัสของหมึกกระดองและหมึกกล้วยที่เก็บรักษาในน้ำแข็งแสดงดัง Table 11 พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาณแอมโมเนีย และปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อของหมึกกล้วย และปริมาณแอมโมเนีย ค่าแรงเฉือน และปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อของหมึกกระดองที่มีความสัมพันธ์ทางตรงกับค่า QIM และมี

ความสัมพันธ์ในทางตรงข้ามกับค่าคุณภาพโดยรวมโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีดัชนีทางเคมีหลายค่าที่สามารถใช้เป็นดัชนีความสดสำหรับหมึกกล้วยชนิดต่างๆ ที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง เช่น อามะทิน (agmatine) สำหรับหมึกกล้วย (*Todaropsis eblanae*) (Paarup *et al.*, 2002) กรดอะมิโนที่เป็นด่าง (basic amino acids) เช่น อาร์จินีน (arginine) และออโรนิน (ornithine) สำหรับหมึกกล้วย (*Todarodes pacificus*) (Ohashi *et al.*, 1991) ทริพโตฟานอิสระ และยูเรียสำหรับหมึกกล้วย (*Loligo plei*) (Lapa-Guimarães *et al.*, 2005) และแอมโมเนีย สำหรับหมึกกล้วย (*I. illecebrosus*) (LeBlanc and Gill, 1984) นอกจากนี้จาก Table 11 จะเห็นว่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ และปริมาณแอมโมเนียมีค่าสูง สำหรับหมึกทั้งสองชนิด เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าคุณภาพทางประสาทสัมผัส (คะแนนคุณภาพโดยรวมและ QIM) กับค่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ (Figure 13) ดัง Figure 18 และ 19 จะเห็นว่ากราฟดังกล่าวมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) สูงอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 0.92 และสามารถใช้ในการทำนายคุณภาพของหมึกทั้งสองชนิดในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งได้ที่ระดับ α เท่ากับ 0.01 ขณะที่กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอมโมเนียกับค่าจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสมีค่าความแปรปรวนที่สูงกว่า โดยมีค่านอกช่วงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ระดับ α เท่ากับ 0.01 (ดังแสดงภาพผนวก ซ2) ทำให้ค่าแอมโมเนียไม่เหมาะสมในการทำนายคุณภาพของหมึกทั้งสองชนิด

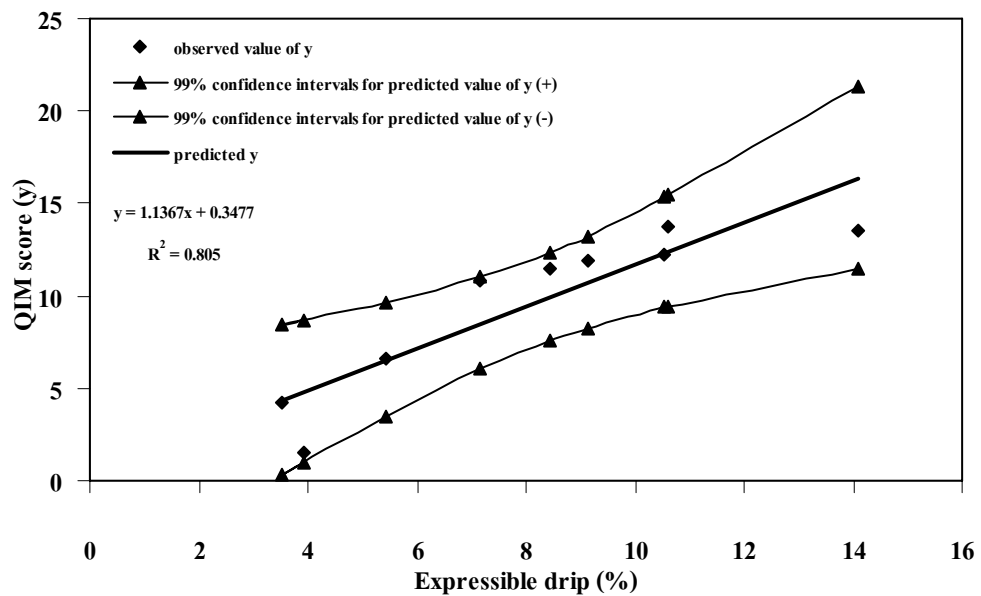
Table 11. Correlation coefficient between objective and subjective qualities of squid and cuttlefish during iced storage.

Parameters	Squid		Cuttlefish	
	QIM	Overall acceptability	QIM	Overall acceptability
TCA-soluble peptide	0.95*	-0.98*	0.59*	-0.70*
ammonia	0.69*	-0.79*	0.75*	-0.83*
Trimethylamine (TMA)	0.46	-0.55*	0.55*	-0.63*
Total Volatide Based Nitrogen (TVBN)	0.57*	-0.70*	0.44	-0.56*
pH	-0.24	0.35	0.19	-0.08
L*	-0.35	0.34	0.02	0.10
a*	0.55*	-0.58*	0.43	-0.49*
b*	-0.57*	0.56*	0.07	-0.06
Shear force	0.63*	-0.63*	0.78*	-0.79*
Expressible drip	0.75*	-0.85*	0.81*	-0.87*
Psychrophilic count	0.38	-0.36	0.43	-0.58*
Total Viable Count (TVC)	0.72*	-0.80*	0.51*	-0.65*

Note: * =significant ($p < 0.01$)

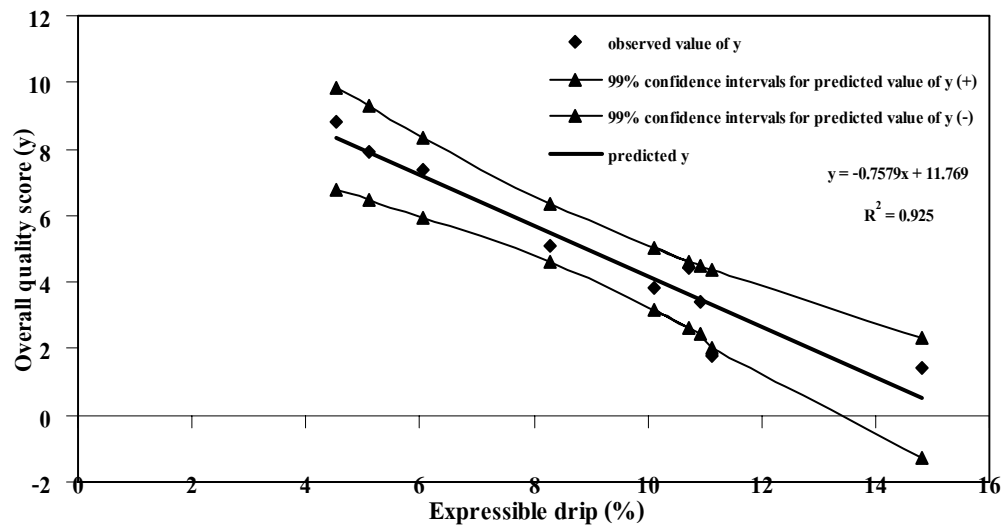


(a)

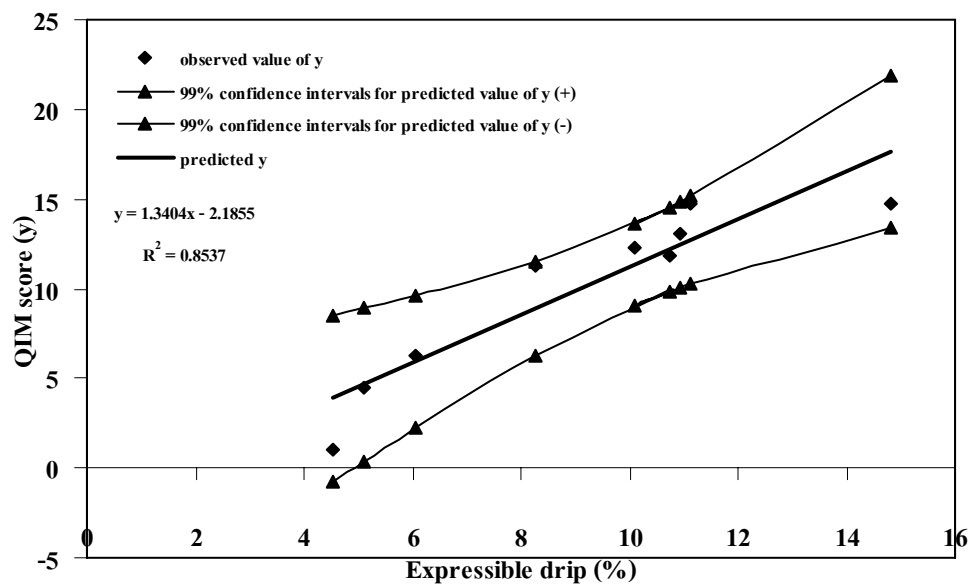


(b)

Figure 18. Correlation regression between sensory analysis (overall quality (a) and QIM (b)) and expressible drip of squid, at 99% confidence intervals.



(a)



(b)

Figure 19. Correlation regression between sensory analysis (overall quality (a) and QIM (b)) and expressible drip of cuttlefish, at 99% confidence intervals.

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนและโครงสร้างจุลภาคของเนื้อหมีระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง

2.1 การวิเคราะห์ทางเคมี

2.1.1 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษา

รูปแบบโปรตีนกล้ามเนื้อลำตัวของหมีกกล้วยและหมีกระดองแสดงดัง Figure 20a และ b ตามลำดับ แถบโปรตีนไมโอซินเส้นหนัก (MHC) (205 kDa) พาราไมโอซิน (110 kDa) และ แอคติน (45 kDa) จะปรากฏในกล้ามเนื้อหมีกกล้วยในช่วงแรกของการเก็บรักษา พบว่าความเข้มของแถบโปรตีน MHC ในกล้ามเนื้อหมีกทั้งสองชนิดจะลดลงหลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษา และแถบโปรตีนแอคตินของหมีกกล้วยความเข้มลดลงเล็กน้อยหลังการเก็บรักษา 8 วัน ขณะที่พาราไมโอซินและแถบโปรตีนอื่นๆไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่า MHC สามารถถูกย่อยสลายได้มากกว่าโปรตีนกล้ามเนื้อชนิดอื่นๆ เช่น แอคติน พาราไมโอซิน สอดคล้องกับการศึกษาของ Dublán-García และคณะ (2006) พบว่าแถบโปรตีนไมโอซินของหมีกกล้วย (*Dosidicus gigus*) หายไปหลังจากการเก็บรักษา 6 วันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และแถบโปรตีนแอคตินมีความเข้มลดลงเล็กน้อยเช่นกัน นอกจากนี้ผลที่ได้ยังสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกของหมีกกล้วยและหมีกระดอง (ดัง Figure 9) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาปากคม (Benjakul *et al.*, 2003) และกุ้งกุลาดำ (Sriket *et al.*, 2007) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า MHC มีแนวโน้มย่อยสลายได้มากกว่าโปรตีนกล้ามเนื้อชนิดอื่นๆ เช่น แอคติน โทโรโปนิน และโทโรโปไมโอซิน

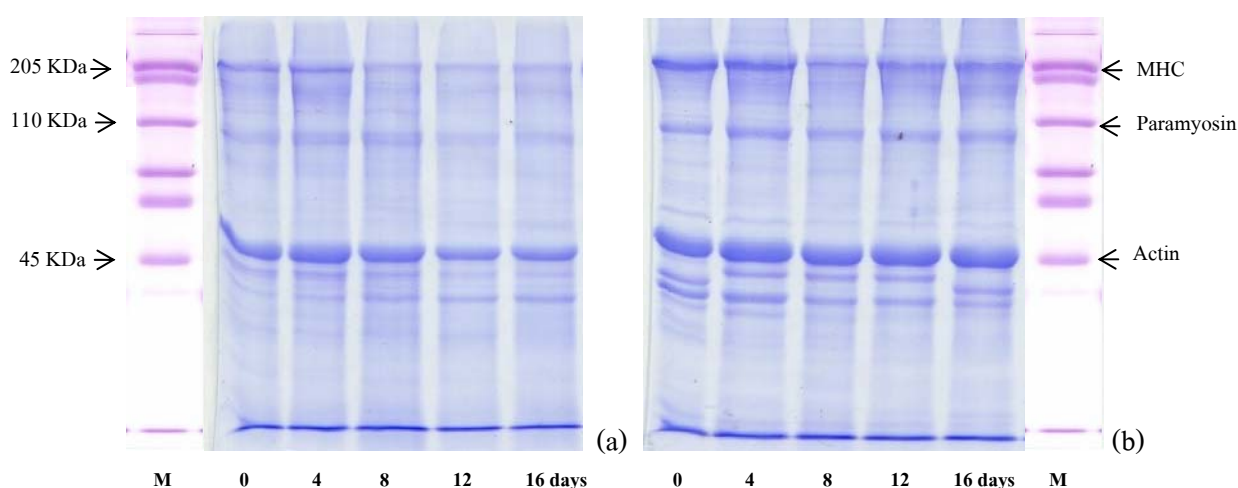


Figure 20. Changes in SDS-PAGE patterns of squid (a) and cuttlefish muscle (b) during iced storage, M= High molecular-weight marker.

2.1.2. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจุลภาคในระหว่างการเก็บรักษา

โครงสร้างจุลภาคของหมึกกล้วยและหมึกกระดองในระหว่างการเก็บรักษาแสดงดัง Figure 21 และ 22 ตามลำดับ ช่วงแรกของการเก็บรักษาเส้นใยกล้ามเนื้อของหมึกกล้วยและหมึกกระดอง (M) มีโครงสร้างที่หนาแน่นและเห็นโครงข่ายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชัดเจน (ลูกศร) วันที่ 4 ของการเก็บรักษาจะเห็นโครงสร้างของเส้นใยที่หลวมขึ้นและไม่เห็นโครงข่ายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หลังจากเก็บรักษานานขึ้น โครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อแยกจากกันอย่างชัดเจนขึ้นแสดงให้เห็นว่าเกิดการย่อยสลายของโปรตีนทำให้โครงสร้างเส้นใยคลายตัวเกิดเป็นช่องว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ สอดคล้องกับ Dublan-Garcia และคณะ (2005) พบว่าเกิดการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดเป็นพื้นที่แบบไม่เป็นระเบียบ (amorphous) จากผลของน้ำในกล้ามเนื้อ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก (Figure 9) และรูปแบบของโปรตีน (Figure 20) ซึ่งส่งผลให้แรงเฉือนที่ลดลง (Figure 14) และความสามารถในการอุ้มน้ำของกล้ามเนื้อ โดยพิจารณาค่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อที่สูงขึ้น (Figure 13)

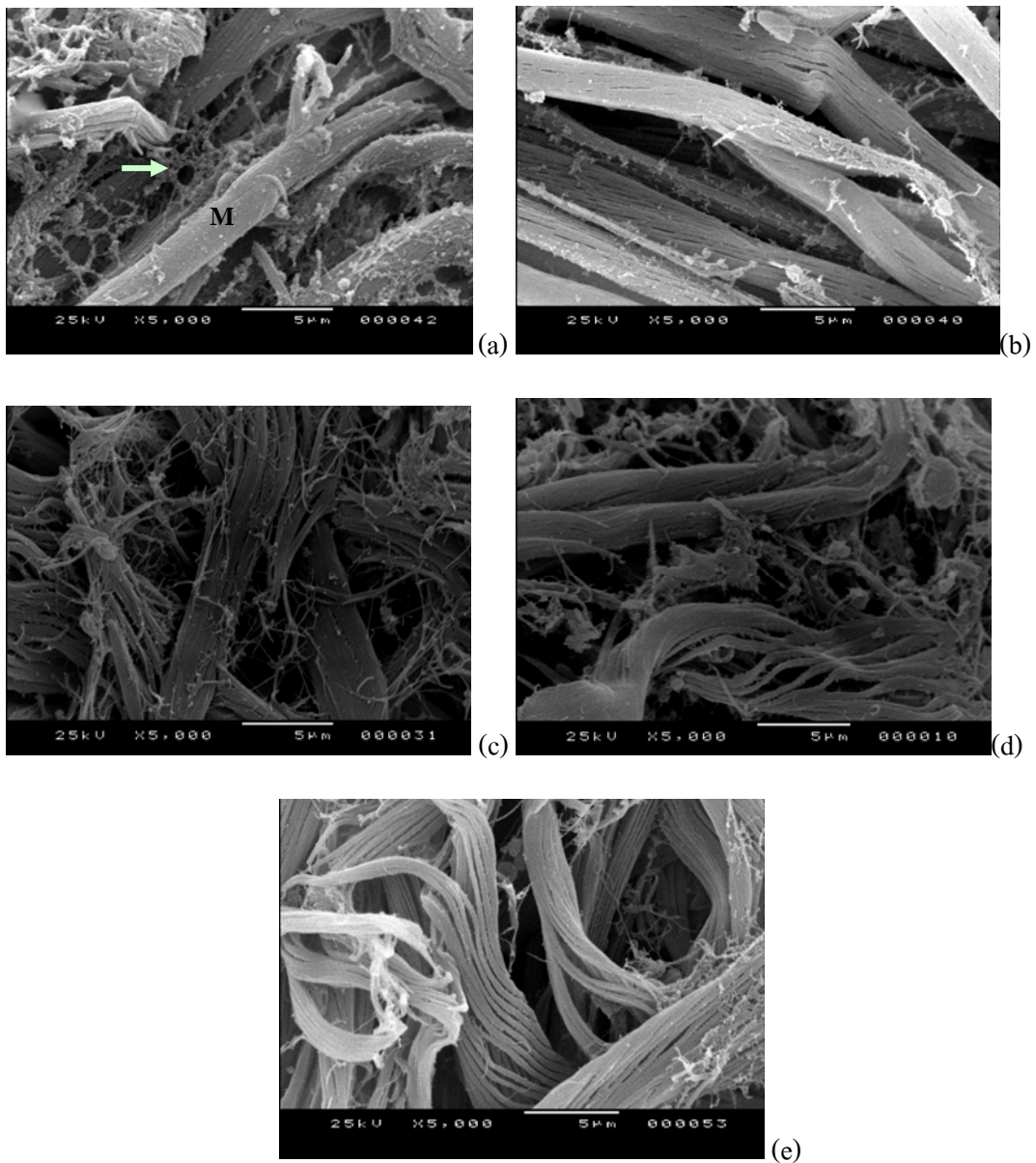


Figure 21. Scanning Electron Microscopic of transverse section of raw squid during iced storage at (a) 0, (b) 4, (c) 8, (d) 12 and (e) 16 days (magnification 5000x, 25 kv), M= muscle cell and arrow= connective tissue fibrils.

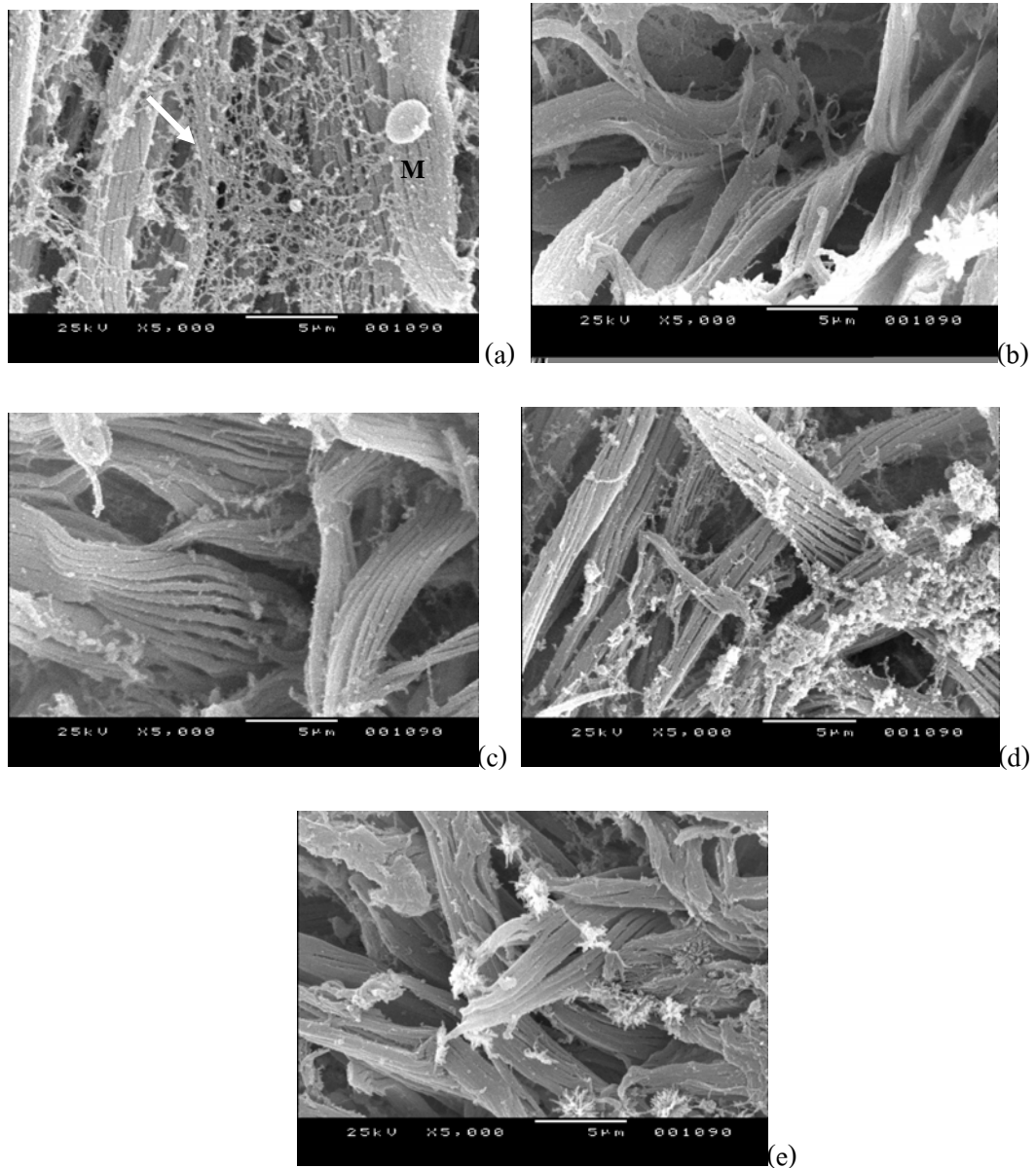


Figure 22. Scanning Electron Microscopic of transverse section of raw cuttlefish during iced storage (a) 0, (b) 4, (c) 8, (d) 12 and (e) 16 days (magnification 5000x, 25 kv), M= muscle cell and arrow= connective tissue fibrils.

2.2 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงแรงเฉือน

การเปลี่ยนแปลงแรงเฉือนของหมึกสดและหมึกต้มสุก แสดงดัง Figure 23 แรงเฉือนของหมึกสดและหมึกที่ต้มสุกทั้งสองชนิดจะลดลงในระหว่างการเก็บรักษา ($p < 0.05$) จากการย่อยสลายของสายโซ่ไมโอซินดังแสดงผลของค่าเพปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก (Figure 9) และรูปแบบโปรตีน (Figure 20) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อ (Figure 21 และ 22) นอกจากนี้ยังพบว่าแรงเฉือนของหมึกต้มสุกมีค่าต่ำกว่าหมึกสด โดยมีสมมติฐานที่อาจเกี่ยวข้องกับกลไกที่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว 3 ข้อได้แก่ ข้อที่ 1 การหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์เป็นผลให้เนื้อสัมผัสนุ่มลง ข้อที่ 2 การแยกตัวของเซลล์ทำให้เส้นใยคอลลาเจนรวมตัวอย่างหลวมๆ ซึ่งลดความสมบูรณ์ของโครงสร้างระหว่างเซลล์ ข้อที่ 3 เกิดจากการลดลงของแรงที่กระทำระหว่างเมมเบรนและคอลลาเจน (Ando *et al.*, 1999) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Otwell และ Hamann (1979) และ Kugino และ Kugino (1994) ซึ่งพบว่ากล้ามเนื้อส่วนลำตัวของหมึกกล้วย (*Loligo bleekeri*) สุกมีเนื้อสัมผัสนุ่มกว่าตัวอย่างสด เนื่องจากโครงข่ายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันถูกทำลายรวมทั้งการสูญเสียจากการละลายและการเกิดเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของคอลลาเจนเป็นเจลาตินในขณะที่เนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อหมึกกล้วยถูกทำให้สุกในน้ำร้อน

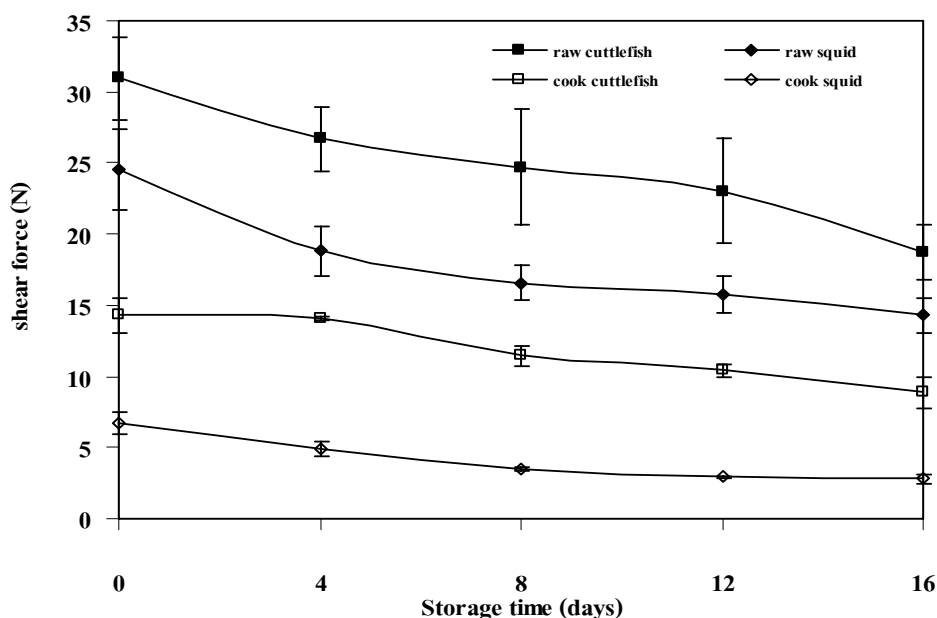


Figure 23. Changes in shear force of raw and cooked squid and cuttlefish during iced storage.

Bars represent the standard deviation from five determinations.

2.3 การเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส

Figure 24 แสดงการเปลี่ยนแปลงของคะแนนเนื้อสัมผัสของหมึกกล้วยและหมึกกระดองระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าคะแนนเนื้อสัมผัสของหมึกทั้งสองชนิดลดลง ($p < 0.05$) โดยทั่วไปเมื่อเก็บรักษาหมึกกล้วยและหมึกกระดองเป็นระยะเวลาานลักษณะบริเวณส่วนลำตัว (mantle) และส่วนหัว (head) มีเนื้อสัมผัสนุ่มลงและส่งผลให้ไม่เป็นที่ยอมรับ โดยหมึกกล้วยจะมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัสที่ชัดเจนกว่าหมึกกระดองเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ความหนาของส่วนลำตัว ที่แตกต่างกัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสอดคล้องกับการลดลงของค่าแรงเฉือน (Figure 23) ดังแสดงจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง ($p < 0.05$) (0.92 และ 0.77 สำหรับหมึกกล้วยและหมึกกระดองตามลำดับ) โดยการทำลายของเส้นใยกล้ามเนื้อและการย่อยสลายของกล้ามเนื้อโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้ออาจส่งผลทำให้เนื้อสัมผัสของหมึกกล้วยและหมึกกระดองนุ่มลง

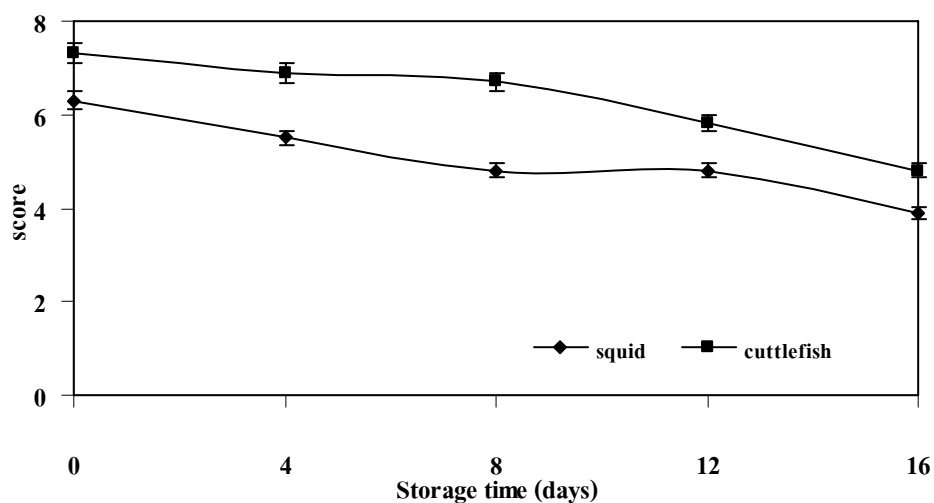


Figure 24. Changes in texture score of raw squid and cuttlefish during iced storage.

Bars represent the standard deviation from twelve determinations.

3. การศึกษาปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นดัชนีคุณภาพของหมึกกล้วย และหมึกกระดองที่เก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง

3.1 การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

3.1.1 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช

การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชของหมึกกล้วยและหมึกกระดองเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส แสดงดัง Figure 25 จะเห็นว่าพีเอชมีค่าลดลงในช่วง 1 เดือนแรกของการเก็บรักษาจากนั้นค่าพีเอชคงที่ตลอดการเก็บรักษา 6 เดือน การลดลงของพีเอชเกิดจากผลของกรดไขมันอิสระจากการไฮโดรไลซิสของไขมันและฟอสโฟลิปิดด้วยเอนไซม์ (Olley *et al.*, 1962 อ้างโดย Thongkeaw, 2003) การศึกษาของ Benjakul และ Sutthipan (2009) พบว่าค่าพีเอชของเนื้อปูดำและปูนิ่มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีค่าเพิ่มขึ้นในช่วง 2 สัปดาห์และลดลงเรื่อยๆ จนถึง 12 สัปดาห์ของการเก็บรักษา ขณะที่ Ben-Gigirey (1999) รายงานว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอัลบาคอร์ ตลอดการเก็บรักษาที่ -18 ถึง -25 องศาเซลเซียส

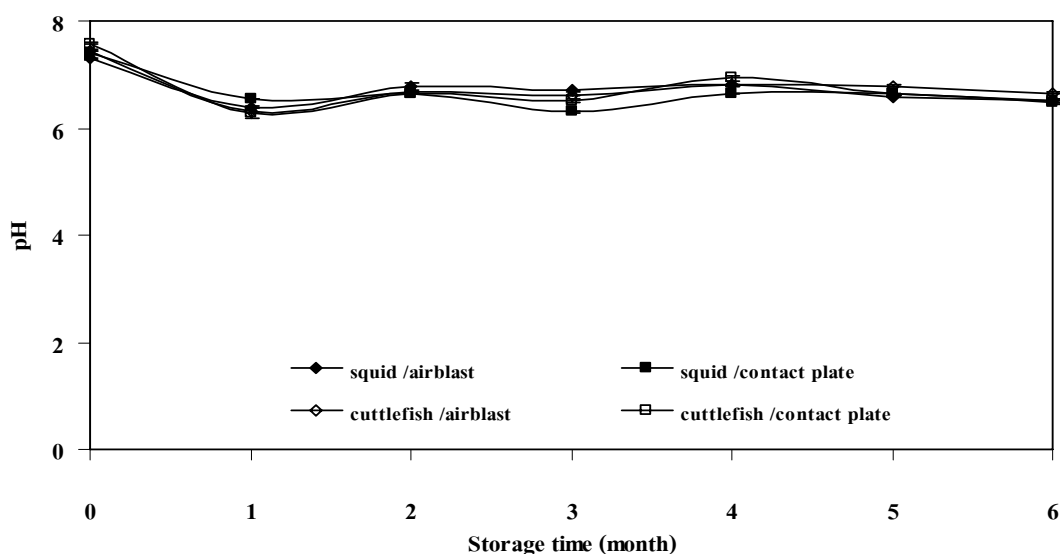


Figure 25. Changes in pH of squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C .

Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on pH ($p < 0.05$)
- freezing methods on pH ($p < 0.05$)
- storage time on pH ($p < 0.05$)

3.1.2 การเปลี่ยนแปลงค่า Thiobabituric acid-reactive substance (TBARS)

การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ของหมึกกล้วยและหมึกกระดองในระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน แสดงดัง Figure 26 ค่า TBARS ของตัวอย่างทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา ($p < 0.05$) และมีอัตราการเพิ่มที่แตกต่างกันระหว่างสองสายพันธุ์ โดยหมึกกล้วยจะมีการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน ขณะที่หมึกกระดองมีการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาและพบว่าหมึกกระดองมีค่า TBARS สูงกว่าหมึกกล้วย ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Benjakul และคณะ (2009) ที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ของเนื้อปูดำและปูน้ำจืดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 12 สัปดาห์ ความแตกต่างของค่า TBARS เกิดจากหมึกแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณแร่ธาตุที่แตกต่างกัน โดยหมึกกล้วย (*Illex argentinus*) มีฟอสฟอลิปีดร้อยละ 73.1 กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (PUFA; polyunsaturated fatty acid) ร้อยละ 47.6 และกรดไขมันร้อยละ 6.8 (Okuzumi and Fujii, 2000) และหมึกกระดอง (*Sepia pharaonis*) มีฟอสฟอลิปีดร้อยละ 87.8 PUFA ประมาณร้อยละ 50.3-54.9 และกรดไขมันร้อยละ 50.3-54.9 (Thanonkeaw *et al.*, 2006a) นอกจากนี้ cephalopods ยังประกอบด้วยเหล็ก (Fe) และทองแดง (Cu) ซึ่งทำหน้าที่เป็นปัจจัยร่วมในกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมอื่นๆ ในเซลล์ รวมทั้งทองแดงยังเป็นองค์ประกอบในโปรตีนฮีโมไซยานิน และกระบวนการหายใจของเม็ดสี (Declair *et al.*, 1978; Thanonkaew *et al.*, 2006a) ธาตุโลหะดังกล่าวมีระดับวาเลนซ์ (valence state) 2 หรือมากกว่า และเป็นโปรออกซิเดนต์ (pro-oxidant) ที่มีประสิทธิภาพ โดยที่ระดับความเข้มข้นเพียง 0.1 ส่วนต่อล้านส่วน ก็สามารถลดระยะเวลาการเนิ่นยวน่าและเพิ่มอัตราการเกิดออกซิเดชันได้ (Nawar, 1996) จากรายงานของ Thanonkaew และคณะ (2006a) พบว่าส่วนลำตัวของหมึกกระดอง (*Sepia pharaonis*) มีเหล็ก (Fe) และทองแดง (Cu) เท่ากับ 2.07 และ 2.54 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ขณะที่หมึกกล้วย (*Loligo duvauceli* และ *Doryteuthis sibogae*) มีทองแดงเท่ากับ 0.15-13.80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.62-1.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Pratfulla *et al.*, 2001) และหมึกกล้วย (*Loligo opalescens*) มีเหล็ก และทองแดง เท่ากับ 1.5 และ 6.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Falandysz, 1991) Benjakul และ Bauer (2001) รายงานว่า การออกซิเดชันของไขมันสามารถเกิดขึ้นได้ในการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งและการทำละลาย เนื่องจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในกระบวนการแช่เยือกแข็งไปทำลายเซลล์และปลดปล่อยโปรออกซิเดนต์ที่ออกมา โดยเฉพาะเหล็กอิสระ นอกจากนี้เหล็กอิสระยังทำหน้าที่เป็นอนุมูลอิสระและเป็นส่วนหนึ่งของ

ปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่เกี่ยวกับออกซิเจน ทำให้เกิดซูเปอร์ออกไซด์ที่มีประจุลบ (anionic) (Harris and Tall, 1994; Benjakul and Sutthipan, 2009)

นอกจากนี้การสูญเสียคุณภาพของอาหารแช่เยือกแข็งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อัตราการแช่เยือกแข็ง การทำละลาย และอุณหภูมิการเก็บรักษา เป็นต้น (Licciardello, 1990; Hui *et al.*, 2004; Boonsumrej *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009) ผลการทดลองยังพบว่าวิธีการแช่เยือกแข็งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ($p < 0.05$) โดยวิธีการแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นของหมึกกล้วยและหมึกกระดอง ซึ่งมีอัตราการแช่เยือกแข็ง 0.68 และ 0.63 เซนติเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จะมีการเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าวสูงกว่าวิธีการแช่เยือกแข็งแบบโลหะสัมผัสซึ่งมีอัตราการแช่เยือกแข็ง 1.36 และ 1.27 เซนติเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงสูงขึ้นชัดเจนหลังจากเก็บรักษา 2 และ 4 เดือน สำหรับหมึกกระดองและหมึกกล้วย ตามลำดับ Aubourg และ Medina (1999) พบว่าปลาคอด (*Gadus morhua*) และปลาแฮดดีอก (*Melanogrammus aeglefinus*) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียสเกิดการไฮโดรไลซิสของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid; FFA) ในช่วงแรกของการเก็บรักษาและลดลงหลังจากเก็บรักษา 3 เดือน ขณะที่ค่า TBA เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งอัตราการแช่เยือกแข็งแบบช้าจะเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดการทำลายผนังเซลล์และโครงสร้างอื่นๆ เช่น ไมโทคอนเดรีย และไลโซโซม เป็นต้น ทำให้เกิดการแยกตัวของเซลล์เมมเบรนและปลดปล่อยของเหลวออกจากเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่อยู่ในกล้ามเนื้อ จึงส่งเสริมให้เกิดการออกซิเดชันสูงกว่าอัตราการแช่เยือกแข็งแบบเร็วซึ่งเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กภายในเซลล์ ทำให้การทำลายเซลล์น้อยกว่า (Erickson, 1997; สุทรวัดน์ เบญจกุล, 2548) สอดคล้องกับการศึกษาของ Boonsumrej และคณะ (2007) ซึ่งทำการแช่เยือกแข็งกุ้ง (*Penaeus monodon*) โดยวิธีแบบลมเย็นซึ่งมีอัตราการแช่เยือกแข็ง 6.8-7.4 เซนติเมตรต่อชั่วโมง และแบบใช้ไครโอเจน ซึ่งมีอัตราการแช่เยือกแข็ง 11.8-21.9 เซนติเมตรต่อชั่วโมง พบว่าการแช่เยือกแข็งทั้งสองวิธีมีค่า TBA เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนการแช่เยือกแข็งและการทำละลายเพิ่มขึ้น การแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นมีการเปลี่ยนแปลงของค่า TBA ที่สูงกว่าแบบใช้ไครโอเจน ซึ่งบ่งบอกถึงการเพิ่มขึ้นของการออกซิเดชันของไขมันจากการปลดปล่อยของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการออกซิเดชัน (oxidative enzyme) และโปรออกซิเดนท์จากเซลล์ออร์แกเนลล์ที่ถูกทำลาย (Srinivasan *et al.*, 1998 อ้าง โดย Boonsumrej *et al.*, 2007)

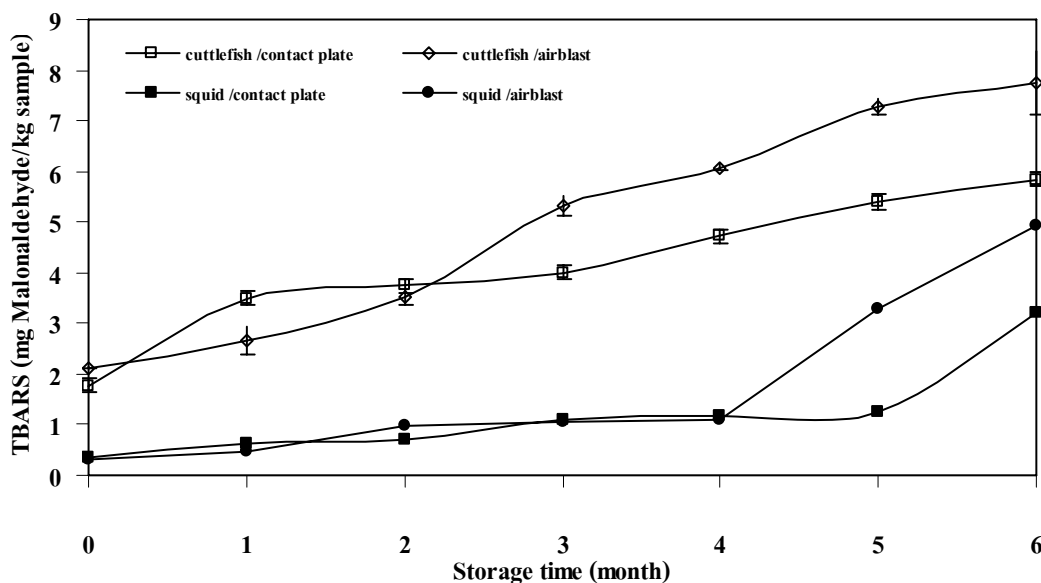


Figure 26. Changes in TBARS of squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C .

Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on TBARS ($p < 0.05$)
- freezing methods on TBARS ($p < 0.05$)
- storage time on TBARS ($p < 0.05$)

3.1.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ

การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ (FA) ของหมึกกล้วยและหมึกกระดองในระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18°C องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน แสดงดัง Figure 27 พบว่าหมึกกล้วยมีการเปลี่ยนแปลง FA สูงกว่าหมึกกระดอง อย่างไรก็ตามวิธีการแช่เยือกแข็งไม่มีผลทำให้ค่า FA แตกต่างกัน ($p < 0.05$) นอกจากนี้ปริมาณ FA เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ในการศึกษาเป็นการวิเคราะห์หาค่า FA หากทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ทั้งหมดจะเป็นการตรวจสอบปริมาณ FA รวมกับฟอร์มาลดีไฮด์ที่จับกับองค์ประกอบอื่นๆ (bound formaldehyde) โดยเฉพาะโปรตีนในกล้ามเนื้อของหมึกก็จะสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น การศึกษาปริมาณ FA ของปูน้ำจืด (Benjakul *et al.*, 2009) ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ และปลาปากคมทั้งตัว เนื้อปลาแล่ และเนื้อปลาสด ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ (Leelapongwattana *et al.*, 2005) พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาที่

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสปริมาณ FA เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) นอกจากนี้ Careche และคณะ (1998) พบว่าปริมาณไดเมทิลเอมีน (DMA) และ FA ของปลาคอดแล้ที่เก็บรักษาในระหว่างการแช่เยือกแข็งมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง ปริมาณของ DMA และ FA ที่เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลาย TMAO จากการทำงานของเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกซิเดส (TMAOase) ซึ่งพบอยู่ในอวัยวะภายในต่างๆ เช่น ม้าม ไต และเนื้อแดงของปลา (Li *et al.*, 2007) และถูกปลดปล่อยออกไปสู่กล้ามเนื้อระหว่างการแปรรูปโดยเฉพาะการทำละลาย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ TMAO ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างรวมถึงอุณหภูมิการเก็บรักษา ชนิดของสัตว์น้ำ ขนาดของหมึก คุณภาพของอาหาร แหล่งที่จับ ความสมบูรณ์ของกล้ามเนื้อ และสภาวะการรีดิวิชั่น เป็นต้น (Parkin and Hultin, 1982; Tejada *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007) เนื่องจาก FA มีความเป็นพิษจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 (ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์) จึงจำเป็นต้องกำหนดมาตรฐานเพื่อความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์อาหาร (Sotelo *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2007) โดยมาตรฐานด้านอาหารกระทรวงสาธารณสุขอิตาลีกำหนดข้อจำกัดปริมาณ FA สำหรับวงศ์ Gadidae เช่น ปลาแฮตตี้ออก และปลาคอด เป็นต้น และคริสเตเซีย เท่ากับ 60 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และกระทรวงเกษตรของจีนกำหนดข้อจำกัดปริมาณ FA สำหรับผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Li *et al.*, 2007) จากการศึกษาในหมึกกล้วยและหมึกกระดองนี้ พบว่าปริมาณ FA ของหมึกกล้วยและหมึกกระดองในเดือนที่ 6 มีค่าอยู่ในช่วง 6.6 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่างและ 6.2 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่างซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานดังกล่าว

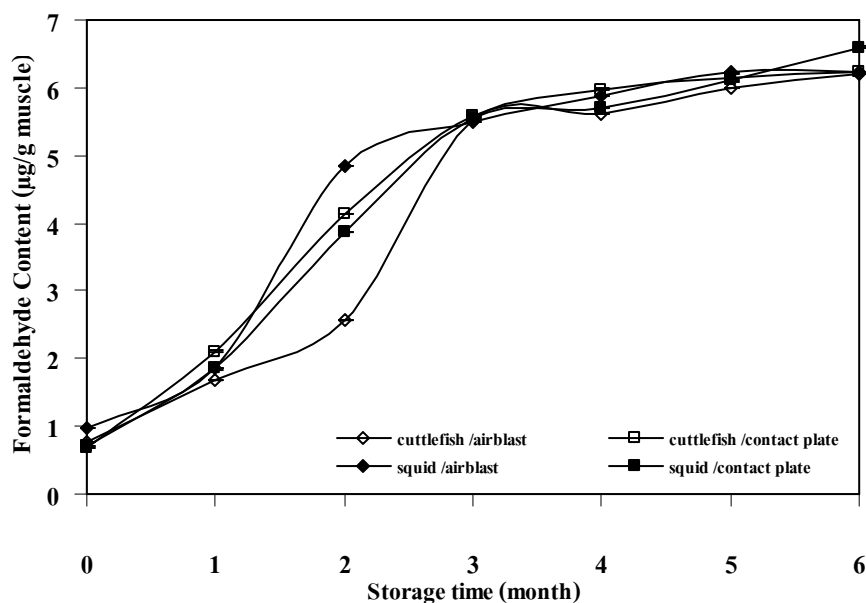


Figure 27. Changes in formaldehyde content of squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C .

Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on FA ($p < 0.05$)
- freezing methods on FA ($p > 0.05$)
- storage time on FA ($p < 0.05$)

3.1.4 การเปลี่ยนแปลงการละลายของโปรตีน

จาก Table 12 แสดงค่าการละลายของโปรตีนของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่แช่เยือกแข็งด้วยวิธีลมเย็นและวิธีแผ่นสัมผัสในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ (S1) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นพีเอช 8.0 ที่มีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 1 (S2) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ที่มีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 1 และสารละลายยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ (S3) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ที่มีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 1 สารละลายยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ และสารละลายเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล ร้อยละ 2 (S4) โดยสารละลาย S1 จะสามารถละลายโปรตีนไมโอไฟบริลตามธรรมชาติ สารละลาย S2 สามารถ

ละลายโปรตีนที่รวมตัวกันด้วยพันธะไอออนิกและพันธะไฮโดรเจน สารละลาย S3 สามารถละลายโปรตีนที่รวมตัวกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและพันธะไฮโดรโฟบิก และสารละลาย S4 สามารถละลายโปรตีนที่รวมตัวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Chawla *et al.*, 1996) จากการทดลองพบว่าค่าการละลายของโปรตีนในสารละลาย S1 ของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่ทำการแช่เยือกแข็งทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ค่าการละลายของหมึกทั้งสองชนิดมีค่าลดลง ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเกิดการรวมตัวและปริมาณโปรตีนไม่โอไฟบริลตามธรรมชาติลดลง ซึ่งค่าการละลายของโปรตีนที่ลดลงมีค่าสอดคล้องกับค่า FA (Figure 27) และ TBARS (Figure 26) ที่เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ค่าการละลายในสารละลาย S2 และ S3 ของหมึกกล้วยและหมึกกระดองมีค่าการละลายสูงกว่า S1 อย่างไรก็ตาม ทุกปัจจัยที่ศึกษาไม่มีผลต่อค่าการละลายในสารละลาย S2 ($p > 0.05$) ขณะที่ชนิดของหมึก และระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อค่าการละลาย S3 และ S4 ($p > 0.05$) และค่าการละลายในสารละลาย S4 ของตัวอย่างสองชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นในสัดส่วนที่สูงกว่าสารละลาย S2 และ S3 แสดงว่าเมื่อเก็บหมึกกล้วยและหมึกกระดองแช่เยือกแข็งในระยะเวลาสั้นขึ้นทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา โดยหมึกกล้วยมีค่าสูงกว่าหมึกกระดอง ($p < 0.05$) และมีสัดส่วนของค่าการละลาย S4 เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนกล้ามเนื้อ ระหว่างการแช่เยือกแข็ง เกิดจากการดึงน้ำออก (dehydration) บางส่วนจากโปรตีนขณะแช่เยือกแข็ง และการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมของโปรตีนซึ่งเกิดจากการทำให้เกลือของสารอนินทรีย์เข้มข้นขึ้น รวมทั้งการเกิดแรงกระทำกับไลพิดกรดไขมันอิสระ และผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไลพิด ตลอดจนการกระทำของ TMAOase (Leelapongwattana *et al.*, 2005) โดย FA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของ TMAOase เป็นสารที่ทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน โดยมีผลกับหมู่โซ่ข้างต่างๆ ของโปรตีนและเหนี่ยวนำให้เกิดการจับตัวกันของโปรตีนภายในโมเลกุล (intramolecular) หรือระหว่างโมเลกุล (intermolecular) โดยการเชื่อมต่อของหมู่เมทิลีน (methylene bridge) มีผลทำให้โปรตีนเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการสกัดของโปรตีนไม่โอไฟบริล และการสูญเสียสมบัติในการอุ้มน้ำ เป็นต้น (Sikorski *et al.*, 1990; Sotelo *et al.*, 1995) Amano และ Yamada (1964); Tejada และคณะ (2002); Li และคณะ (2007) กล่าวว่า FA ที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อปลาในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการสูญเสียเนื้อสัมผัสและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ตลอดจนการยอมรับลดลง Benjakul และ Sutthipan (2009) พบว่าการละลายของโปรตีนของปูนิ่มลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 12 สัปดาห์ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าเกิดการเสียสภาพ

โปรตีนเพิ่มขึ้นทำให้มีปริมาณโปรตีนไมโอไฟบริลตามธรรมชาติลดลง การละลายของโปรตีนที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของพันธะไดซัลไฟด์ และค่าไฮโดรโฟบิก รวมทั้งการรวมตัวของโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนต์และพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้พันธะไดซัลไฟด์และพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์อาจจะเกี่ยวข้องกับการเชื่อมประสานกันของสายโซ่ไมโอซินเส้นหนักส่งผลให้เกิดเป็นสายโพลีเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและการรวมตัวของโปรตีนได้ Thanonkaew และคณะ (2008) พบว่าการละลายของโปรตีนของหมีกกระดอง (*Sepia pharaonis*) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ มีการละลายที่ลดลงในช่วง 8 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา เนื่องจากโปรตีนเกิดการเสียสภาพและโปรตีนเกิดการจับตัวกัน โดยปัจจัยที่มีผลต่อการจับตัวของโปรตีนไมโอไฟบริลและโปรตีนสโตรมาขึ้นอยู่กับเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง (Moral *et al.*, 2002)

นอกจากนี้สารประกอบที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมัน เช่น มาโลนัลดีไฮด์ (malonaldehyde) โพรพานอล (propanol) และเฮกซะนอล (hexanal) (Shenouda, 1980 อ้างโดย Jaing and Lee, 2004) สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่หน้าที่ที่จำเพาะกับสายโซ่ข้างของโปรตีน ได้แก่ หมู่ซัลไฟด์ (-SH) ของซิสเตอีน (cysteine) หมู่อะมิโนของไลซีน (lysine) และที่ตำแหน่ง N-terminal ของกรดแอสพาทิก (aspartic acid) ไทโรซีน (tyrosine) เมทไทโอนีน (methionine) และอาร์จินีน (arginine) (Jaing and Lee, 2004) ซึ่งอันตรกิริยาดังกล่าวส่งผลให้ไปเพิ่มส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของโปรตีน ทำให้โปรตีนละลายน้ำได้น้อยลง Thanonkaew และคณะ (2008) พบว่าหมีกกระดอง (*Sepia pharaonis*) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์มีการเปลี่ยนแปลงของค่าไฮโดรโฟบิกที่พื้นผิว (surface hydrophobicity) เพิ่มขึ้นและสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของออกซิเดชันของไขมัน แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนอาจเกิดจากอนุมูลอิสระของไขมันหรือผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของกรดไขมันมีผลเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่สายโซ่ข้าง (amino acid residue) โดยทั่วไปการเสียสภาพและการจับตัวกันของโปรตีนจะเริ่มต้นจากการเกิดพันธะไดซัลไฟด์และตามด้วยการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และพันธะไฮโดรเจนที่อยู่ในและระหว่างโมเลกุล (Buttkus, 1970)

Table 12 Changes in protein solubility (%) of squid and cuttlefish muscle frozen using different freezing methods during storage at -18°C .

Storage time (month)	Sample/condition															
	cuttlefish								squid							
	Air-blast freezing				Contact plate freezing				Air-blast freezing				Contact plate freezing			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
0	54.73±5.87	51.60±8.37	62.89±4.55	67.46±6.37	51.96±2.63	56.40±7.99	61.84±9.56	68.02±4.81	54.17±9.22	55.06±9.62	56.71±6.81	67.79±5.85	43.35±4.37	60.01±9.72	63.27±4.35	71.01±3.64
1	43.83±7.17	50.67±9.24	53.38±3.84	76.12±6.39	44.12±4.38	56.23±7.82	62.95±6.66	69.44±5.89	50.20±3.41	55.77±4.69	56.84±6.90	75.82±1.82	42.37±3.45	57.68±6.40	62.46±2.75	79.05±6.02
2	47.75±2.96	60.89±4.68	68.77±2.92	67.21±7.90	40.98±3.43	52.15±5.86	68.38±9.36	69.13±9.02	51.34±7.81	50.51±3.39	60.14±7.70	77.14±8.54	40.86±6.00	57.11±7.75	59.29±9.56	75.49±7.19
3	48.93±2.18	53.17±2.81	70.77±3.01	75.24±7.38	41.39±5.46	53.37±6.50	59.44±7.25	78.01±3.51	46.56±8.62	53.37±6.50	49.45±6.34	79.51±5.93	38.97±2.86	51.26±2.01	57.32±3.39	76.95±2.73
4	43.28±0.02	58.99±7.91	63.61±7.18	50.93±8.98	35.27±5.26	46.83±8.20	46.10±5.50	73.07±6.42	44.45±2.35	44.20±6.96	46.67±9.99	74.66±4.56	40.25±6.04	51.72±10.54	55.18±5.73	79.69±7.53
5	48.96±6.38	60.39±7.22	53.70±4.29	66.45±9.83	44.14±7.55	50.63±8.19	46.45±1.27	79.96±1.65	36.39±3.00	48.79±0.39	53.47±6.77	75.40±7.54	38.90±3.26	55.39±4.54	51.88±4.31	79.38±3.36
6	44.66±0.76	58.99±7.91	69.06±3.85	73.08±7.19	38.82±5.96	58.06±6.06	56.52±3.58	69.87±9.37	35.39±5.47	53.41±6.33	54.40±3.89	80.82±6.10	39.71±1.36	47.86±8.64	48.22±1.50	75.60±9.53

Note: Mean \pm SD from triplicate determinations. S1; 0.6M KCl, S2; 20mM Tris-HCl+1% SDS, S3; 20mM Tris-HCl+1% SDS+8M Urea, S4; 20mM Tris-HCl+1% SDS+

8M Urea+2% β ME

Different letters within the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

Significant effect of S1

Significant effect of S2

Significant effect of S3

Significant effect of S4

- cephalopod samples on protein solubility ($p > 0.05$)
- freezing methods on protein solubility ($p < 0.05$)
- storage time on protein solubility ($p < 0.05$)
- cephalopod samples on protein solubility ($p > 0.05$)
- freezing methods on protein solubility ($p > 0.05$)
- storage time on protein solubility ($p > 0.05$)
- cephalopod samples on protein solubility ($p < 0.05$)
- freezing methods on protein solubility ($p > 0.05$)
- storage time on protein solubility ($p < 0.05$)
- cephalopod samples on protein solubility ($p < 0.05$)
- freezing methods on protein solubility ($p > 0.05$)
- storage time on protein solubility ($p < 0.05$)

3.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

3.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจุลภาคในระหว่างการเก็บรักษา

โครงสร้างจุลภาคของหมึกกล้วยและหมึกกระดองในระหว่างการเก็บรักษาโดยวิธีการแช่เยือกแข็งแบบแผ่นสัมผัสและแบบลมเย็น แสดงดัง Figure 28 และ 29 ตามลำดับ จะเห็นว่าในช่วงแรกของการเก็บรักษาเส้นใยกล้ามเนื้อของหมึกกล้วยและหมึกกระดองเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ลักษณะมัดเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นเกรียวแน่นและมีโครงข่ายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ปกคลุมมัดเส้นใยกล้ามเนื้อ (Figure 28 (A, E) และ 29 (A, E)) แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน ลักษณะมัดเส้นใยกล้ามเนื้อเริ่มมีการคลายเกลียวเกิดขึ้นและโครงข่ายร่างแหจะเริ่มหายไปทำให้เกิดช่องว่าง (Figure 28 (B, F) และ 29 (B, F)) ในช่วงเดือนที่ 4 และเดือนที่ 6 ลักษณะมัดเส้นใยกล้ามเนื้อมีการคลายเกลียวเกิดขึ้นอย่างชัดเจน และทำให้เกิดช่องว่างระหว่างมัดเส้นใยกล้ามเนื้อมากขึ้น (Figure 28 (C, D, G, H) และ 29 (C, D, G, H)) การเก็บรักษาในสถานะแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลาอันยาวนานมีผลต่อการสูญเสีย น้ำ โดยเฉพาะน้ำระหว่างช่องว่างของไมโอไฟบริลลา ซึ่งจะเห็นได้จากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระ (Figure 30) และปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ (Figure 31) จากการทดลองจะเห็นว่าวิธีการแช่เยือกแข็งแบบแผ่นสัมผัสและแบบลมเย็นมีผลต่อโครงสร้างจุลภาคของหมึกทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลจากอัตราการแช่เยือกแข็ง (แบบแผ่นสัมผัสและแบบลมเย็นของหมึกกล้วยและหมึกกระดองเท่ากับ 1.36 1.27 และ 0.68 0.63 เซนติเมตรต่อชั่วโมงตามลำดับ) ไม่แตกต่างกันมากพอที่จะส่งผลต่อความแตกต่าง ขณะที่การศึกษาของ Lopkulkiaert และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของกุ้งขาวที่ทำการแช่เยือกแข็ง 3 วิธี คือ โดยวิธีการเก็บที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส (อัตราการแช่เยือกแข็ง 0.69 เซนติเมตรต่อชั่วโมง) วิธีแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วลม 6.5 เมตรต่อวินาที (อัตราการแช่เยือกแข็ง 5.95 เซนติเมตรต่อชั่วโมง) และวิธีไคโครเจนด้วยไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส (อัตราการแช่เยือกแข็ง 27.71 เซนติเมตรต่อชั่วโมง) ผลจากการตรวจสอบโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) พบว่าเกิดช่องว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นในวิธีการแช่เยือกแข็งแบบแช่และโครงสร้างของเซลล์ถูกทำลายโดยกลไกการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ อาจเกิดจากขนาดของผลึกน้ำแข็งที่ใหญ่ ทำให้สูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำของเซลล์โปรตีน (Srinivasan *et al.*, 1997 อ้างโดย Lopkulkiaert *et al.*, 2009) สำหรับกุ้งขาวที่แช่เยือกแข็งด้วยวิธีไคโครเจน ยังคงมีลักษณะคล้ายกุ้งสด ซึ่งการแช่เยือกแข็งแบบเร็วจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งที่เล็กและโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าการแช่เยือกแข็งแบบช้า (Lopkulkiaert *et al.*, 2009) การศึกษาของ Llorca และคณะ (2007) พบว่าวิธีการแช่เยือกแข็งแบบช้าและเก็บรักษาเป็นระยะเวลาอันยาวนานเป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียน้ำระหว่างช่องว่างของ

ไมโอไฟบริลลาเนื่องจากการเพิ่มขนาดของผลึกน้ำแข็ง นอกจากนี้การศึกษาของ Ueng และ Chow (1998) ได้สังเกตการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อลำตัวของหมึกกล้วย (*Loligo edulis*) และหมึกกระดอง (*Illex argentinus*, *Sepia pharaonis*) ที่แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (phase contrast) พบว่ามัดเส้นใยกล้ามเนื้อของหมึกไม่เป็นระเบียบ มัดเส้นใยกล้ามเนื้อเกิดความเสียหายและเกิดการจับตัวกันเมื่อการเก็บรักษานานขึ้น โดยการเกิดและการเพิ่มขนาดของผลึกน้ำแข็งจะไปมีผลในการทำลายเส้นใยกล้ามเนื้อ ส่งผลให้เกิดการจับตัวกันของโปรตีนเพิ่มขึ้น รวมทั้งการเชื่อมประสานของโปรตีนจากผลของการเพิ่มขึ้นของ DMA และ FA ทำให้เนื้อมีความเหนียวเพิ่มขึ้น

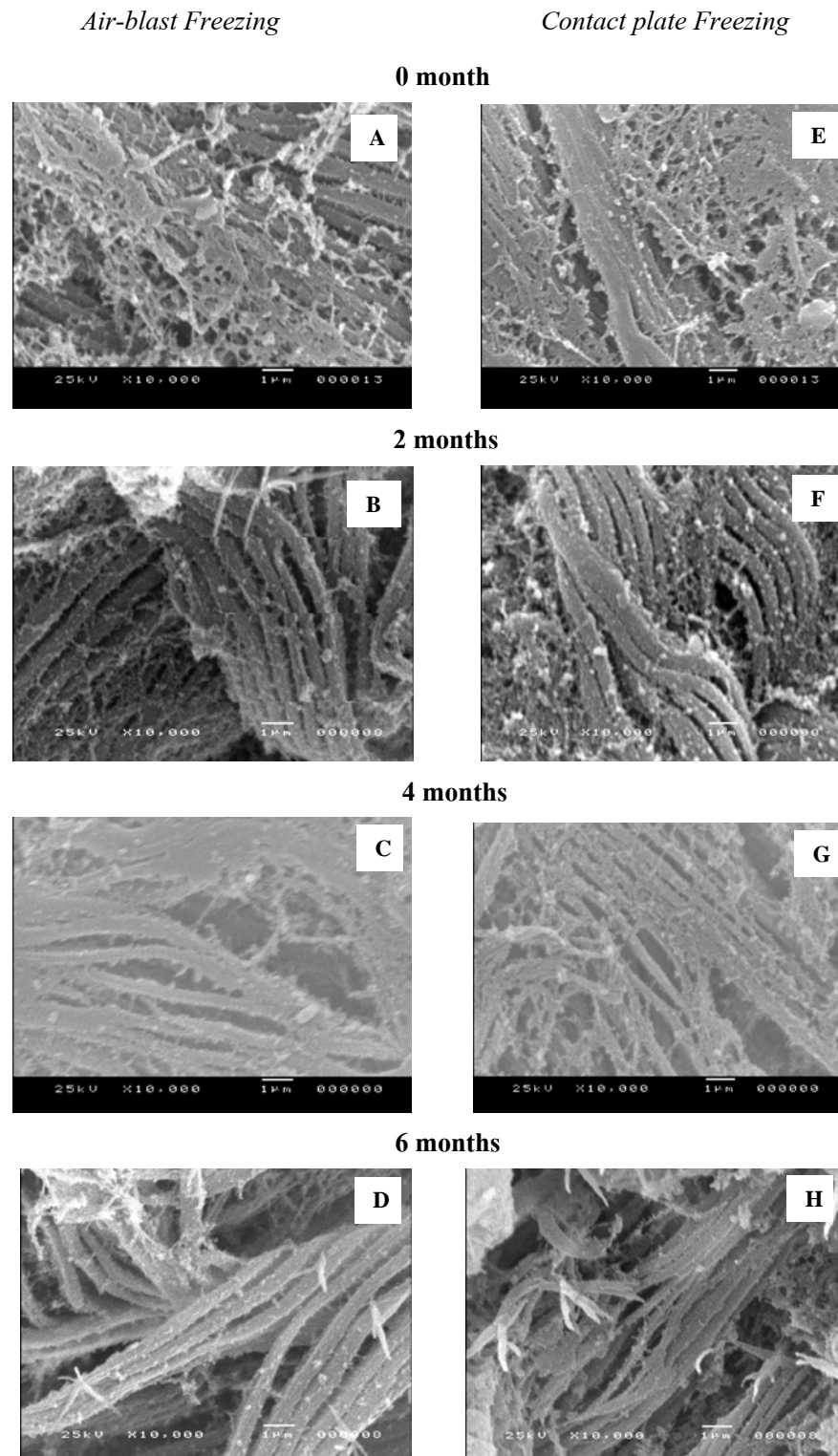
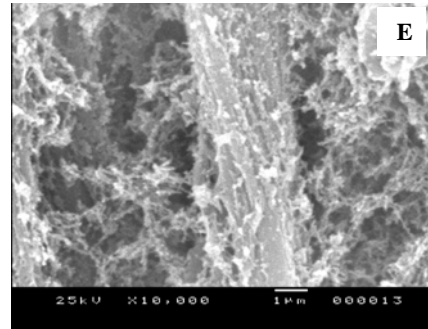
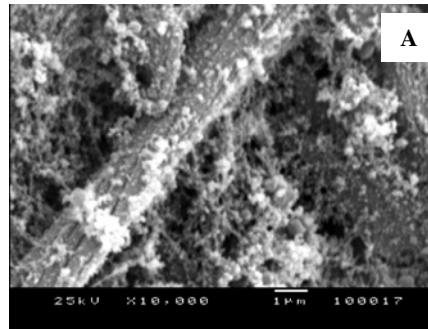


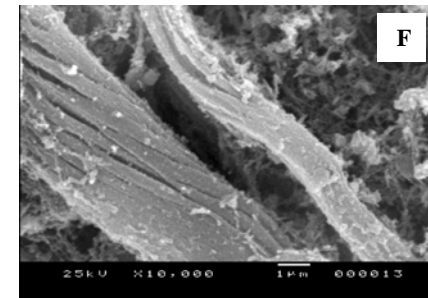
Figure 28. Scanning Electron Microscope of transverse section of cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C , 0 month, (A, E); 2 months, (B, F); 4 months, (C, G) and 6 months, (D, H), respectively.

*Air-blast Freezing**Contact plate Freezing*

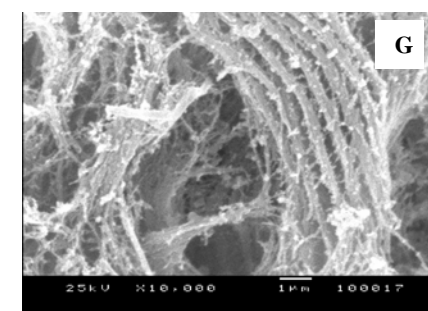
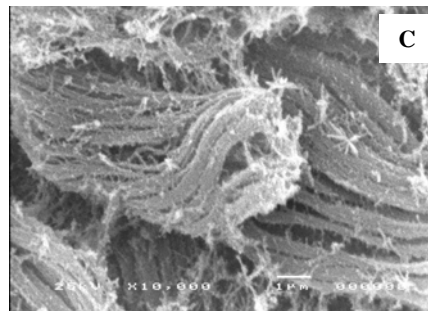
0 month



2 months



4 months



6 months

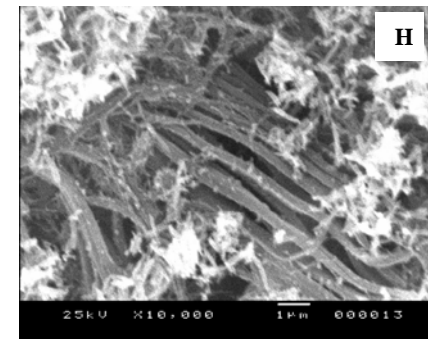
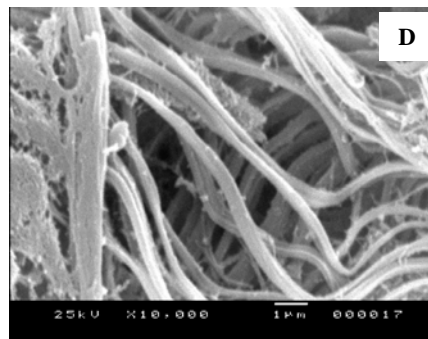


Figure 29. Scanning electron microscope of transverse section of squid frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C , 0 month, (A, E); 2 months, (B, F); 4 months, (C, G) and 6 months, (D, H), respectively.

3.2.2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระ (free drip) และปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ (expressible drip)

การเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณน้ำอิสระและปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อของหมึกกล้วย และหมึกกระดองที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีต่างๆ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส แสดงดัง Figure 30 และ 31 พบว่าวิธีการแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณน้ำอิสระและปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำอิสระและค่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อของหมึกทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเก็บรักษานานขึ้น ($p < 0.05$) หมึกกล้วยมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระและปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อมากกว่าหมึกกระดอง เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าในช่วงเดือนที่ 4 และเดือนที่ 6 หมึกกล้วย (Figure 28 (C, D, G, H)) และหมึกกระดอง (Figure 29 (C, D, G, H)) ลักษณะมัดเส้นใยกล้ามเนื้อมีการคลายเกลียวเกิดขึ้นอย่างชัดเจน และทำให้เกิดช่องว่างระหว่างมัดเส้นใยกล้ามเนื้อมากขึ้น การเก็บรักษาในสภาวะแช่เยือกแข็ง เป็นระยะเวลานาน มีผลต่อการสูญเสียน้ำ โดยเฉพาะน้ำระหว่างช่องว่างของไมโอไฟบริลลา (Dublan-Garcia *et al.*, 2005) การศึกษาของ Ueng และ Chow (1998) ทำการเก็บรักษาหมึก 3 ชนิด คือ หมึกกล้วย neritic (*Loligo edulis*) หมึกกระดอง (*Sepia pharaonis*) และหมึกกล้วย Argentina (*Illex argentinus*) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อจะมีปริมาณมากกว่าปริมาณน้ำอิสระ ค่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อเพิ่มสูงขึ้นบ่งบอกถึงการสูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำของกล้ามเนื้อในระหว่างการเก็บรักษา การสูญเสียน้ำในกระบวนการแช่เยือกแข็งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ โดยทั่วไปการแช่เยือกแข็งแบบช้าจะทำให้สูญเสียของเหลวมากกว่าการแช่เยือกแข็งแบบเร็ว ผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่จะเกิดขึ้นในกระบวนการแช่เยือกแข็งแบบช้าและจะเพิ่มขนาดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา โดยผลึกน้ำแข็งดังกล่าวจะทำให้เซลล์เกิดความเสียหายส่งผลทำให้สูญเสียน้ำมากขึ้น (Boegh-Soerensen and Jul, 1985 อ้างโดย Ngapo *et al.*, 1999; Lopkulkiaert *et al.*, 2009) และความสามารถในการอุ้มน้ำของกล้ามเนื้อจะสัมพันธ์กับโครงสร้างเส้นใยไมโอไฟบริล และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในเนื้อสด เนื่องจากเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในช่วงการเก็บรักษา (Tsuchiya *et al.*, 1978; Zayas, 1997; Dublan-Garcia *et al.*, 2005) Siddaiah และคณะ (2001) พบว่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อของปลาตะเพียน (silver carp; *Hypophthalmichthys molitrix*) เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 180 วัน Benjakul และคณะ (2003) ได้ทำการเก็บรักษาปลาทรายแดง (*Nemipterus bleekeri*) ปลาดาวหวาน (*Priacanthus tayenus*) ปลาปากคม (*Sauruda micropectoralis*) และปลาดาวเขียว (*Pennachai macrophthalmus*) พบว่าปริมาณ

ของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (24 สัปดาห์) ซึ่งอัตราการเพิ่มขึ้นนี้จะแตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์ ขนาดและตำแหน่งของการเกิดผลึกน้ำแข็งในระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษา ซึ่งมีผลทำให้คุณภาพของเนื้อลดลง (Voyle, 1974; Añon and Calvelo, 1980; Offer and Knight, 1988 อ้างโดย Ngapo *et al.*, 1999) นอกจากนี้ปริมาณ FA (Figure 25) และค่า TBARS (Figure 24) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ($p < 0.05$) อาจเป็นอีกปัจจัยที่มีผลส่งเสริมให้เกิดการสูญเสียไขมันในกล้ามเนื้อของหมึกกล้วยและหมึกกระดอง โดย FA มีผลทำให้โปรตีนเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการสกัดของโปรตีนไมโอไฟบริล และการสูญเสียสมบัติในการอุ้มน้ำ เป็นต้น (Sikorski *et al.*, 1990; Sotelo *et al.*, 1995) รวมทั้งกระบวนการออกซิเดชันของไขมันมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี การสูญเสียไขมันในกล้ามเนื้อ การเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัส และกลิ่นที่ผิดปกติ (Decker and Hultin, 1992; Thanonkaew *et al.*, 2006c)

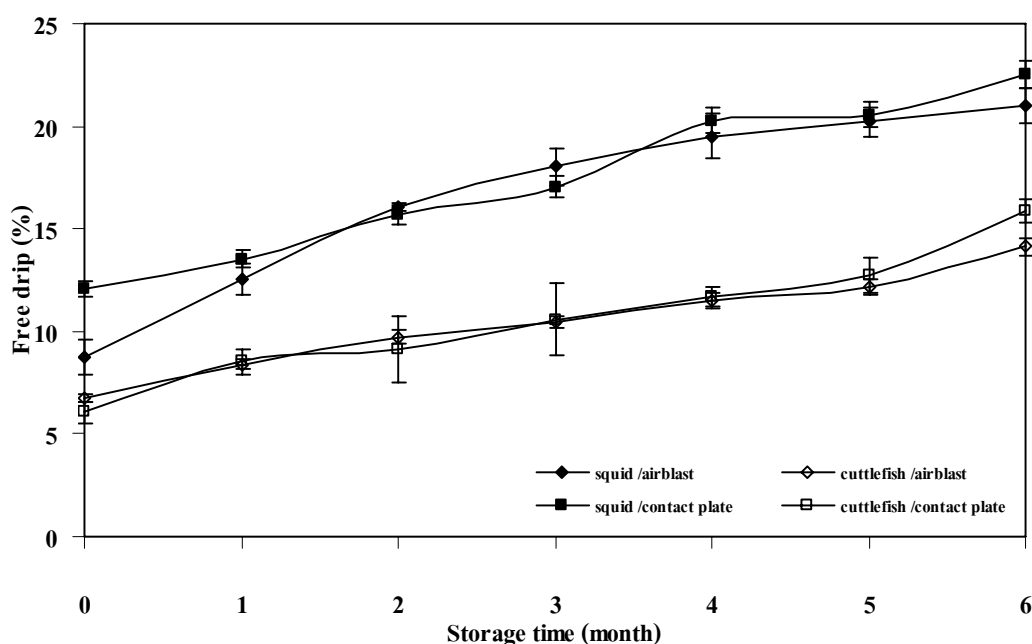


Figure 30. Changes in the free drip of deskinmed squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C .

Bars represent the standard deviation from triplicated determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on free drip ($p < 0.05$)
- freezing methods on free drip ($p > 0.05$)
- storage time on free drip ($p < 0.05$)

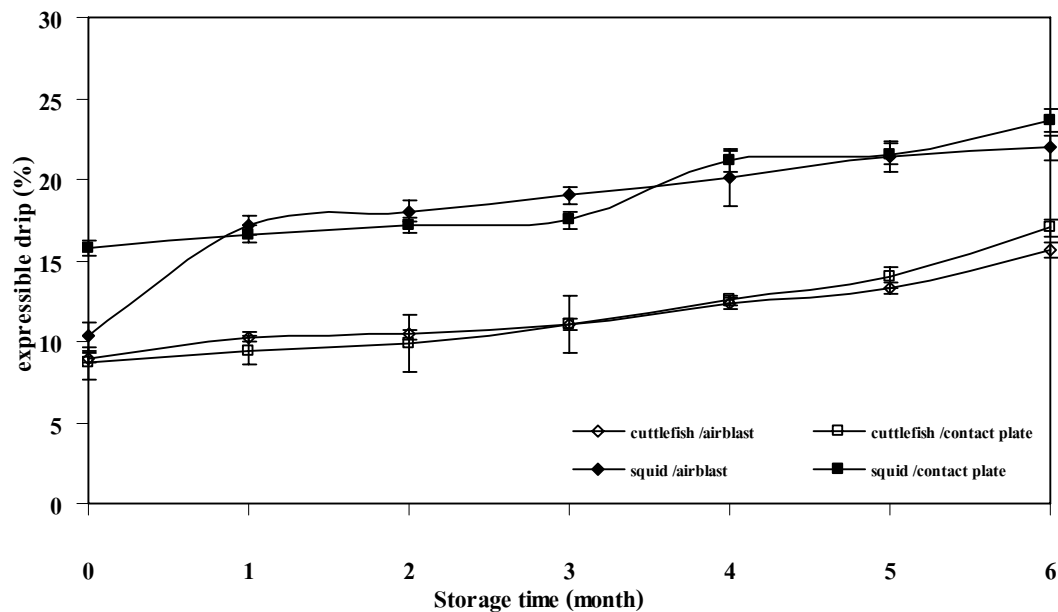


Figure 31. Changes in the expressible drip of deskinning squid and cuttlefish frozen using air-blast freezing and contact plate freezing methods during storage at -18°C .

Bars represent the standard deviation from triplicated determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on expressible drip ($p < 0.05$)
- freezing methods on expressible drip ($p > 0.05$)
- storage time on expressible drip ($p < 0.05$)

3.2.3 การสูญเสียน้ำหนักหลังจากทำให้สุก (cooking loss)

จาก Figure 32 แสดงการสูญเสียน้ำหนักหลังจากทำให้สุกของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีต่างๆ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°C ระยะเวลา 6 เดือน พบว่าวิธีการแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังจากทำให้สุก ($p > 0.05$) เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานการสูญเสียน้ำหนักเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยหมึกกล้วยมีค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังจากทำให้สุกสูงกว่าหมึกกระดอง ($p < 0.05$) เมื่อทำให้เนื้อหมึกกล้วย (*Loligo pealei*) สุก โครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อจะเปลี่ยนรูปไปเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและความชื้นภายในกล้ามเนื้อมีค่าลดลง (Otwell and Hamann, 1979) และการแช่เยือกแข็งจะทำให้เซลล์เมมเบรนได้รับความเสียหาย (Rahelic and Puac, 1985 อ้างโดย Lagerstedt *et al.*, 2008) ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำลงและเกิดการสูญเสียน้ำหนักหลังจากทำให้สุกสูงขึ้น

(Wheeler *et al.*, 1990 อ้างโดย Lagerstedt *et al.*, 2008) การสูญเสีย น้ำจากกล้ามเนื้อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอไฟบริลลา (Buttkus, 1974 อ้างโดย Otwell and Hamann, 1979) การสูญเสีย น้ำหนักหลังจากทำให้สุกระหว่างเนื้อที่เก็บที่อุณหภูมิเย็นและแช่เยือกแข็งจะแตกต่างกัน เนื่องจากเซลล์กล้ามเนื้อของเนื้อที่ถูกแช่เยือกแข็งจะถูกทำลายในระหว่างการแช่เยือกแข็ง (Lagerstedt *et al.*, 2008) สอดคล้องกับการศึกษาของ Benjakul และ Sutthipan (2009) ซึ่งพบว่าการสูญเสีย น้ำหนักหลังจากทำให้สุกของเนื้อปูแช่เยือกแข็งเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยความร้อนส่งเสริมให้เกิดการจับตัวกันและเสถียรภาพของโปรตีนทำให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีน และการเสถียรภาพของโปรตีนในระหว่างการแช่เยือกแข็งทำให้โปรตีนไวต่อการเสถียรภาพด้วยความร้อนจึงเป็นสาเหตุทำให้โปรตีนจับตัวกันมากขึ้น นอกจากนี้ Stanley และ Smith (1984 อ้างโดย Llorca *et al.*, 2007) แสดงให้เห็นว่าความร้อนส่งผลให้เกิดการสูญเสีย น้ำเนื่องจากโปรตีนเกิดการเสถียรภาพและมีลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อรวมตัวกันทำให้เกิดช่องว่างระหว่างโปรตีนไมโอไฟบริลลา

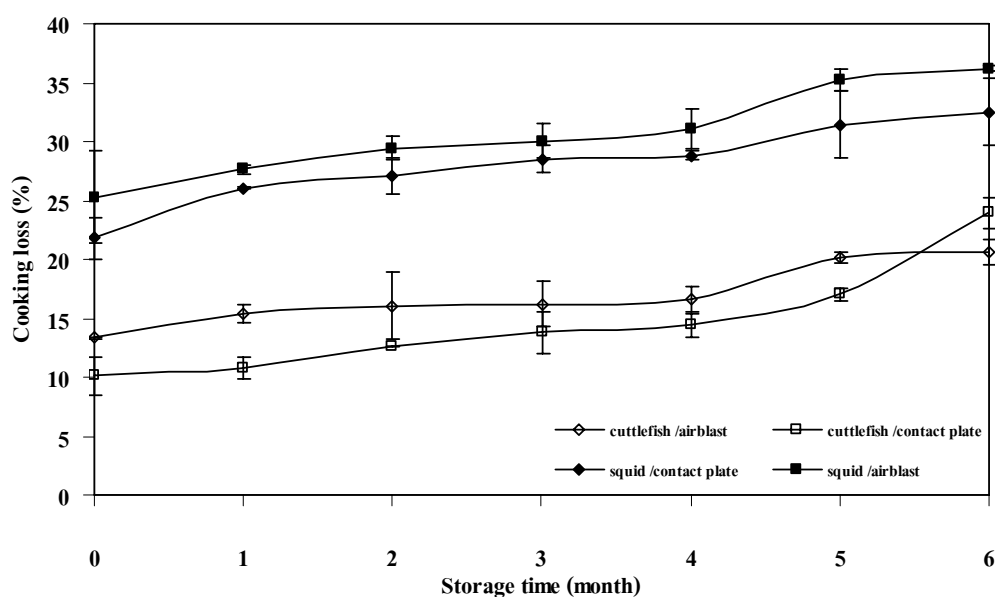


Figure 32. Changes in the cooking loss of squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C .

Bars represent the standard deviation from triplicated determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on cooking loss ($p < 0.05$)
- freezing methods on cooking loss ($p > 0.05$)
- storage time on cooking loss ($p < 0.05$)

3.2.4 การเปลี่ยนแปลงแรงเคียน

การเปลี่ยนแปลงของแรงเคียนของหมึกกล้วยสดและหมึกกระดองสดที่ทำการแช่เยือกแข็งโดยวิธีลมเย็นและแผ่นสัมผัสแสดงดัง Figure 33 พบว่าวิธีการแช่เยือกแข็งทั้งสองวิธีมีค่าแรงเคียนไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และพบว่าหมึกกระดองมีค่าแรงเคียนมากกว่าหมึกกล้วยเนื่องจากความแตกต่างกันของความหนาของส่วนลำตัว (mantle) นอกจากนี้ระยะเวลาเก็บรักษามีผลต่อค่าแรงเคียน ($p<0.05$) โดยตัวอย่างหลังกระบวนการแช่เยือกแข็ง (เดือนที่ 0) มีเนื้อสัมผัสแน่นและค่าแรงเคียนสูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการเก็บรักษา (1-6 เดือน) เนื่องจากตัวอย่างเดือนที่ 0 มีลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อและโครงข่ายร่างแหของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใกล้เคียงกับหมึกสดเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Figure 28 (A, E) และ 29 (A, E)) หลังจากเก็บรักษา 1 เดือนค่าแรงเคียนลดลงในทุกตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่างหลังแช่เยือกแข็ง (เดือนที่ 1) ผลึกน้ำแข็งในกระบวนการแช่เยือกแข็งและในช่วงการทำละลายเป็นสาเหตุของการสลายตัวของไลโซโซมและการปลดปล่อยเอนไซม์โปรตีนเนสจากซาร์โคพลาสซึ่งทำให้กล้ามเนื้อโปรตีนอ่อนตัว (Makri, 2009) จากนั้นหลังจากการเก็บรักษา 2-6 เดือน เนื้อสัมผัสเริ่มแข็งขึ้นเนื่องจากการเสียดสภาพและเกิดการจับตัวกันของโปรตีนไมโอไฟบริล จะเห็นได้จากการละลายของโปรตีน (Table 12) การสูญเสียปริมาณน้ำอิสระ (Figure 30) ปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ (Figure 31) และการสูญเสียน้ำหลังจากทำให้สุก (Figure 32) รวมทั้งเกิดจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไขมัน (lipid degradation products) โดยทำให้เกิดแรงกระทำระหว่างโปรตีนไมโอไฟบริลลา จึงทำให้เนื้อสัมผัสเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง (Makri, 2009) นอกจากนี้อาจเกิดจากโปรตีนเกิดการเชื่อมประสานกัน จากการเพิ่มขึ้นของ FA (Figure 27) ในระหว่างการแช่เยือกแข็ง (Stanley and Hultin, 1982; Ueng and Chow, 1998) ตรี วาทกิจ (2552) รายงานว่าผลของการเสียดสภาพของโปรตีนจะมีผลต่อกล้ามเนื้อปลาเกิดการสูญเสียน้ำและความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง ทำให้เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อแข็งหรือหยาบกระด้าง และคุณภาพของเนื้อปลาเสื่อมลง เช่น เนื้อปลาแข็งและเหนียว (tough) เป็นเส้นใย (fibrous) แห้ง (dry) และรสชาติ จืดชืด (poor taste) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sigurgisladottir และคณะ (2000) พบว่าปลาแซลมอนแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน ปลาแซลมอนแช่เยือกแข็งมีค่าแรงเคียนต่ำกว่าปลาแซลมอนสด การแช่เยือกแข็งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกล้ามเนื้อโดยเกิดการเสียดสภาพและจับตัวกันของโปรตีนไมโอไฟบริลลา ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงสิ้นสุดในการเก็บรักษามากกว่าในช่วงแรกของการเก็บรักษา

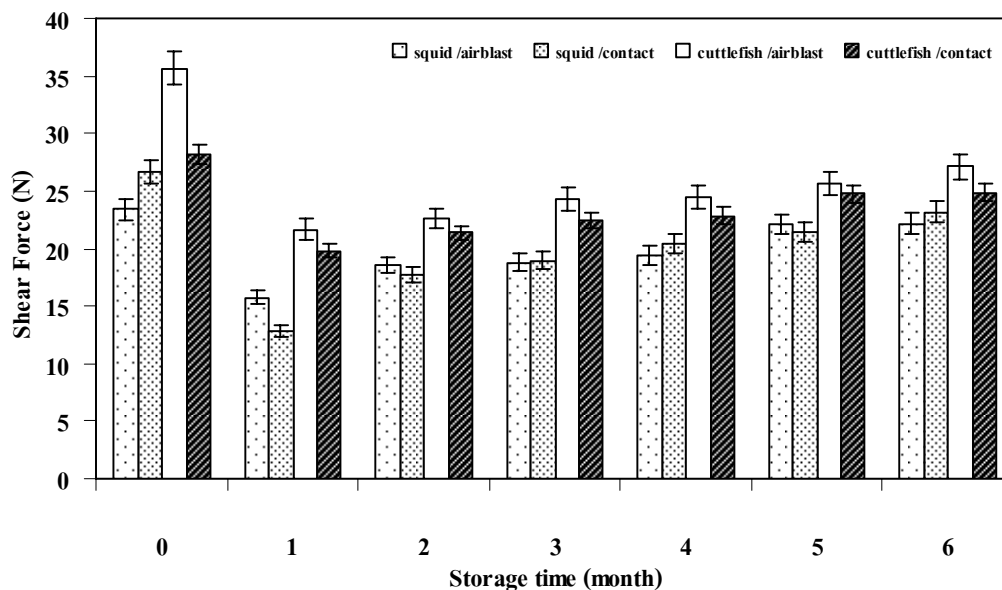


Figure 33. Changes in shear force of raw deskinmed squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during frozen storage at -18°C

Bars represent the standard deviation from five determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on texture ($p < 0.05$)
- freezing methods on texture ($p > 0.05$)
- storage time on texture ($p < 0.05$)

3.2.5 การเปลี่ยนแปลงค่าสี

Table 13, 14 และ 15 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า L^* , a^* และ b^* ของลำตัวหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่ลอกหนังหลังการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีแบบลมเย็นและแบบโลหะสัมผัสระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°C องศาเซลเซียส พบว่าวิธีการแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อค่า L^* , a^* และ b^* ($p > 0.05$) ขณะที่ระยะเวลาการเก็บรักษามีผลทำให้ค่า L^* (ค่าความสว่าง) ของหมึกกล้วยและหมึกกระดองมีค่าลดลง ($p < 0.05$) โดยทั่วไปหมึกที่ผ่านการเก็บรักษาจะมีการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีแดงหรือสีเหลืองเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ความขาว (ความสว่าง) ลดลง และค่า a^* (ค่าสีแดง-สีเขียว) และค่า b^* (ค่าสีเหลือง-สีน้ำเงิน) มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา ($p < 0.05$) และพบว่าหมึกกล้วยจะมีค่า a^* มากกว่าหมึกกระดองตั้งแต่ช่วงแรกจนถึงสิ้นสุดของการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนี้บ่งบอกถึงการติดสีแดงบนเนื้อของหมึกกล้วยเพิ่มขึ้น ขณะที่ความเข้มของค่า b^* ของหมึกกระดองมีอัตราการเพิ่มขึ้นมากกว่าหมึกกล้วย ทำให้เห็นลักษณะเป็นจุดสีเหลืองบนลำตัวของ

หมึกกระดองได้ชัดเจนกว่าหมึกกล้วย การเปลี่ยนแปลงสีของหมึกแช่เยือกแข็งเป็นสิ่งสำคัญต่อลักษณะปรากฏและการยอมรับ ซึ่งโดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็งมีผลมาจากการออกซิเดชันของไขมันและกระบวนการย่อยสลายของเม็ดสี (Daias *et al.*, 1994) การเปลี่ยนแปลงสีที่แตกต่างกันของหมึกแต่ละสายพันธุ์อาจเกิดจากความแตกต่างของเม็ดสีที่ปรากฏบนผิวหนังส่วนลำตัวของหมึกทั้งสองชนิด โดยการเปลี่ยนแปลงสีของหมึกกระดองเกิดจากกลุ่มของเม็ดสีแดง เหลือง น้ำตาลและดำที่อยู่บนชั้นเอริโดเฟอร์ (iridophores) และลิวโคเฟอร์ (leucophore) ส่วนในหมึกกล้วยเม็ดสีจะประกอบด้วยกลุ่มของเม็ดสีเหลือง ส้ม แดง ดำและม่วงซึ่งจะอยู่บนผิวของลำตัว (Wikipedia, 2009) ในระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาผนังเซลล์ของเม็ดสี อาจถูกทำลายโดยผลึกน้ำแข็ง ทำให้เม็ดสีถูกปลดปล่อยออกมาข้อมติบนลำตัวของหมึกกล้วยได้ เช่นเดียวกับการศึกษาในหมึกกระดอง (*Sepia pharaonis*) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ (Thanonkeaw *et al.*, 2008) การเพิ่มขึ้นของสีเหลืองในหมึกกระดองอาจเป็นผลจากการออกซิเดชันของไขมัน ดังเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของค่า TBARS (Figure 24) ในทิศทางเดียวกันและปลาแฮร์ริงที่เก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 9 สัปดาห์ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นของค่าสีเหลืองมีความสัมพันธ์กับการออกซิเดชันของไขมัน (Hamre *et al.*, 2003; Thanonkeaw *et al.*, 2005) สารประกอบที่เกิดขึ้นระหว่างการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ คีโตน อัลดีไฮด์ แอลกอฮอล์ ไฮโดรคาร์บอน กรด และอีโพอไซด์ สามารถทำให้เกิดกลิ่นรสที่ผิดปกติและทำปฏิกิริยากับโปรตีนส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี (Khayat and Schwall, 1983 อ้างโดย Thanonkeaw *et al.*, 2006c) โดยสีเหลืองหรือน้ำตาลที่เกิดขึ้นเกิดจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่ใช่เอนไซม์จากปฏิกิริยาระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการออกซิเดชันของไขมันกับหมู่เอมีนที่อยู่ส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดหรือหมู่เอมีนของโปรตีน (Thanonkeaw *et al.*, 2005; Thanonkeaw *et al.*, 2006a)

Table 13 Changes in L* values of deskinning squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C .

Samples	Freezing	Storage time (month)						
		0	1	2	3	4	5	6
Cuttlefish	Air-blast freezing	78.05±0.69	74.77±0.84	73.92±1.76	71.00±0.64	70.42±1.55	70.74±1.33	62.39±1.70
	Contact plate freezing	76.16±1.26	74.49±1.01	70.7±1.82	70.18±1.85	69.12±3.57	69.85±0.57	68.15±1.76
Squid	Air-blast freezing	71.86±2.87	71.11±1.76	70.49±0.84	65.61±1.70	63.35±1.33	63.03±0.64	57.80±1.55
	Contact plate freezing	72.60±1.26	70.19±1.01	68.53±3.57	66.82±1.76	65.00±1.85	63.52±0.57	61.78±1.82

Mean \pm SD from five determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on L* ($p < 0.05$)
- freezing methods on L* ($p > 0.05$)
- storage time on L* ($p < 0.05$)

Table 14 Changes in a* values of deskinning squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C .

Samples	Freezing	Storage time (month)						
		0	1	2	3	4	5	6
Cuttlefish	Air-blast freezing	-3.79±0.42	-2.96±0.71	-2.16±0.24	-2.13±0.37	-2.07±0.23	-2.02±0.25	-0.77±0.94
	Contact plate freezing	-3.13±0.37	-2.42±1.03	-2.12±0.33	-1.98±0.41	-1.92±0.37	-1.35±0.63	-0.88±0.50
Squid	Air-blast freezing	0.30±1.08	0.46±0.79	0.45±1.17	1.09±0.82	2.15±1.38	2.66±2.21	4.33±1.04
	Contact plate freezing	-1.30±0.55	1.34±1.06	1.86±2.04	2.18±1.58	2.28±2.03	2.45±1.68	3.49±2.84

Mean \pm SD from five determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on a* ($p < 0.05$)
- freezing methods on a* ($p > 0.05$)
- storage time on a* ($p < 0.05$)

Table 15 Changes in b* values of deskinned squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C .

Samples	Freezing	Storage time (month)						
		0	1	2	3	4	5	6
Cuttlefish	Air-blast freezing	4.21 \pm 3.46	4.94 \pm 2.16	5.04 \pm 2.15	5.91 \pm 2.42	7.39 \pm 3.16	7.44 \pm 2.49	8.65 \pm 3.23
	Contact plate freezing	5.08 \pm 3.29	5.09 \pm 3.29	5.31 \pm 2.60	6.28 \pm 3.04	6.70 \pm 2.59	7.71 \pm 2.83	8.77 \pm 1.48
Squid	Air-blast freezing	-1.93 \pm 0.80	1.82 \pm 0.70	4.43 \pm 1.43	3.80 \pm 0.61	4.52 \pm 1.36	5.16 \pm 0.75	6.98 \pm 1.46
	Contact plate freezing	1.64 \pm 2.03	3.04 \pm 0.83	3.40 \pm 0.90	3.50 \pm 0.67	3.78 \pm 1.76	5.28 \pm 0.54	9.45 \pm 0.49

Mean \pm SD from five determinations.

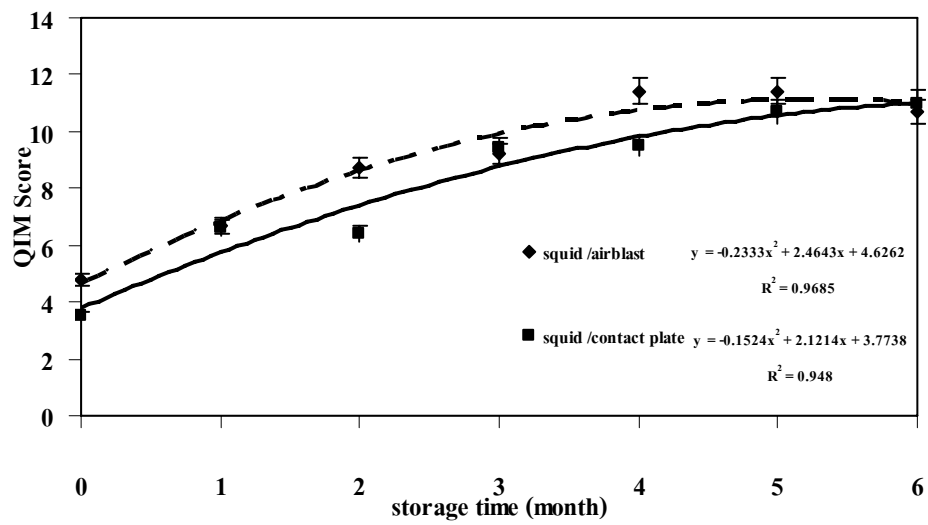
Significant effects of

- cephalopod samples on b* ($p < 0.05$)
- freezing methods on b* ($p > 0.05$)
- storage time on b* ($p < 0.05$)

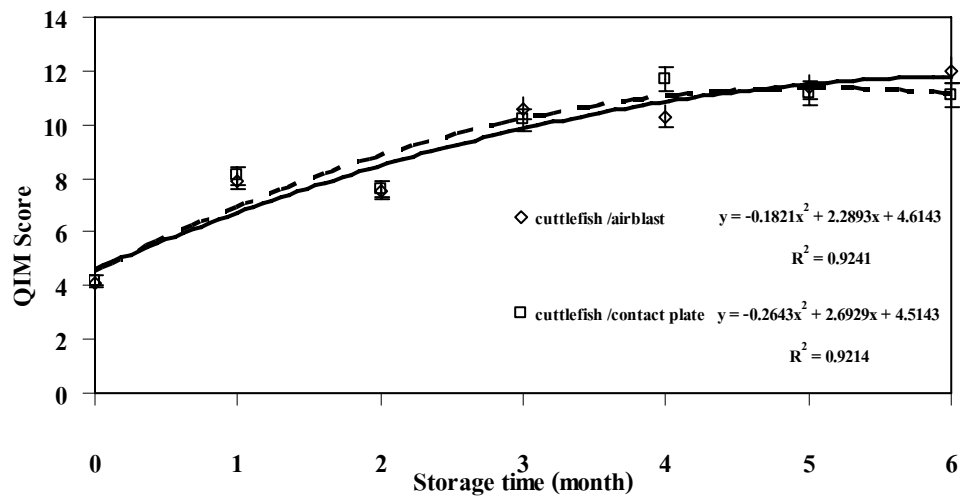
3.3 การเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัส

3.3.1 การเปลี่ยนแปลงของ QIM

Figure 34 (a และ b) แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า QIM ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส สำหรับหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีต่างๆ ตามลำดับ โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์แบบพหุนามที่มีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) สำหรับหมึกกล้วยที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีแบบลมเย็นและแบบแผ่นสัมผัสมีค่า 0.966 และ 0.948 และหมึกกระดองที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีแบบลมเย็นและแบบแผ่นสัมผัสมีค่า 0.924 และ 0.921 ตามลำดับ จะเห็นว่า คะแนน QIM ของหมึกทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษา ($p < 0.05$) และวิธีการแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อค่า QIM ของหมึกกระดองและหมึกกล้วย ($p > 0.05$) โดยคะแนน QIM หลังการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 6 เดือน ของหมึกกล้วยที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีแบบลมเย็นและแบบแผ่นสัมผัสมีค่า 10.7 และ 11 และหมึกกระดองที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีแบบลมเย็นและแบบแผ่นสัมผัสมีค่า 12 และ 11.1 ตามลำดับ ขณะที่ระดับคะแนน QIM สูงสุดของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 16 วัน มีค่า 13.51 และ 14.79 ตามลำดับ ซึ่งการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งจะมีการเปลี่ยนแปลงที่ช้ากว่าแบบแช่น้ำแข็ง โดยการเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญต่อการเพิ่มของค่า QIM โดยลักษณะปรากฏส่วนของลำตัวของหมึกทั้งสองชนิดมีลักษณะอ่อนนุ่มลง ส่วนการเปลี่ยนแปลงกลิ่น พบว่ามีกลิ่นสาหร่ายอ่อนๆ ในช่วงเดือนแรกและพบกลิ่นคาวเล็กน้อยในช่วงเดือนที่ 3 จนกระทั่งถึงเดือนที่ 6 และไม่พบกลิ่นเน่าเสียหรือกลิ่นแอมโมเนียตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา



(a)



(b)

Figure 34. Changes in QIM score of squid (a) and cuttlefish (b) frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C for 6 months.

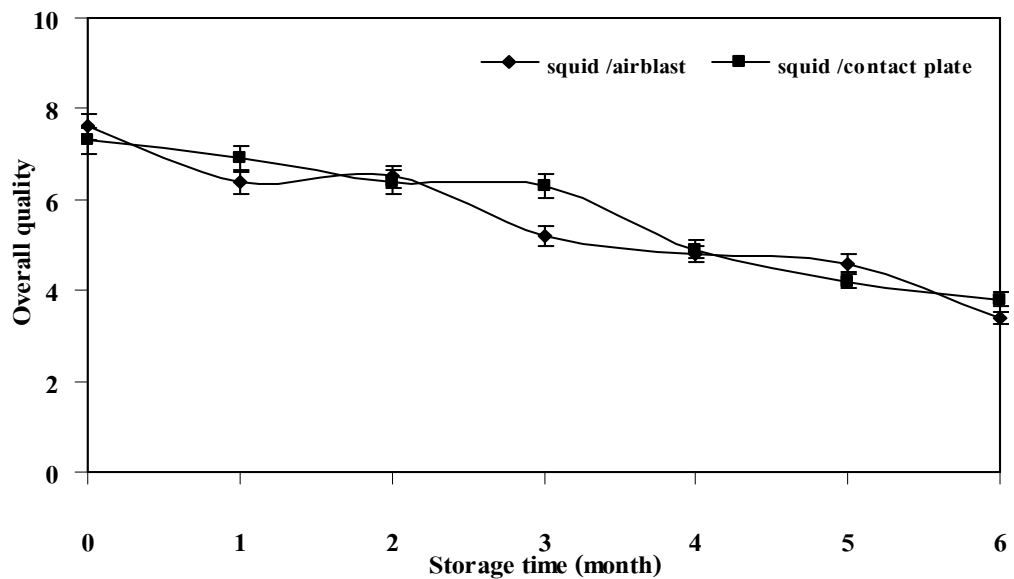
Bars represent the standard deviation from twelve determinations.

Significant effects of

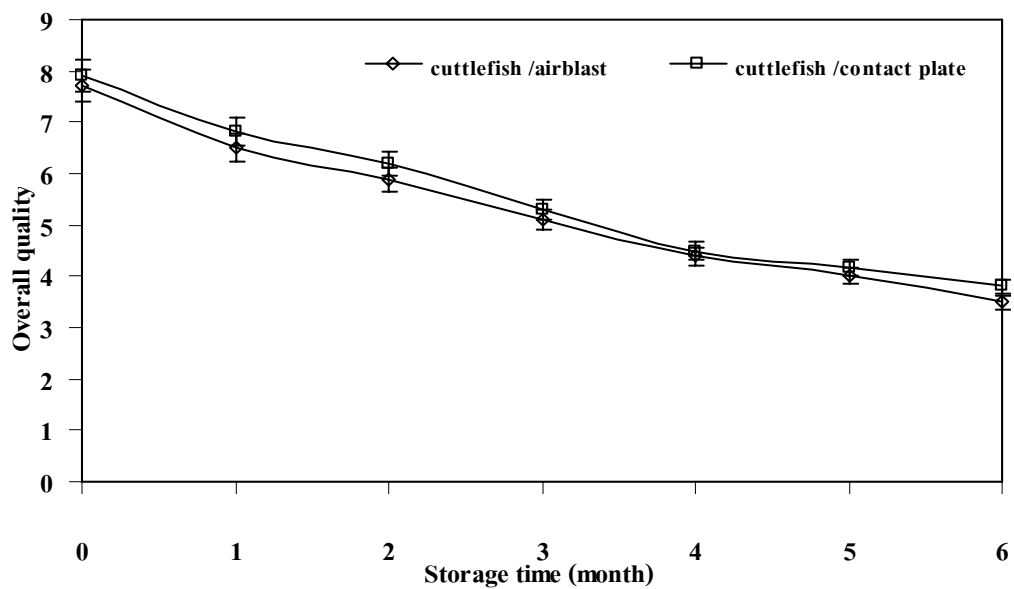
- cephalopod samples on QIM score ($p < 0.05$)
- freezing methods on QIM score ($p > 0.05$)
- storage time on QIM score ($p < 0.05$)

3.3.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพโดยรวม

Figure 35 (a และ b) แสดงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพโดยรวมของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีต่างๆ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส กราฟคะแนนคุณภาพโดยรวมของหมึกทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับเวลา โดยหมึกกล้วยที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีแบบลมเย็นและแบบแผ่นสัมผัสมีค่า R^2 เท่ากับ 0.952 และ 0.953 และหมึกกระดองที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีแบบลมเย็นและแบบแผ่นสัมผัสมีค่า R^2 เท่ากับ 0.977 และ 0.972 ตามลำดับ คะแนนคุณภาพโดยรวมของหมึกทั้งสองชนิดลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) แสดงว่าคุณภาพของหมึกลดลง และพบว่าชนิดของหมึกและวิธีการแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อคะแนนคุณภาพโดยรวม และการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าคะแนนอยู่ในระดับไม่ยอมรับแต่ไม่ถึงระดับปฏิเสธ โดยหมึกกล้วยที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีแบบลมเย็นและแบบแผ่นสัมผัสมีคะแนน 3.4 และ 3.8 และหมึกกระดองที่ทำการแช่เยือกแข็งด้วยวิธีแบบลมเย็นและแบบแผ่นสัมผัสมีคะแนน 3.5 และ 3.8 ตามลำดับ เนื่องจากหมึกทั้งสองชนิดจะมีลักษณะปรากฏ เช่น ลำตัวอ่อนนุ่ม เม็ดสีแตก สีของลำตัวข้อมติดเป็นสีม่วง ผิวหนังเหียว่นและถลอก เป็นต้น ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากหมึกสดที่มีลักษณะลำตัวใส และคงตัวเป็นรูปทรง เม็ดสีมีขนาดเล็ก ผนังไม่ถลอก เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อการเสื่อมเสียดังกล่าวขึ้นอยู่กับคุณภาพของสัตว์น้ำเริ่มต้น การเตรียมก่อนการแช่เยือกแข็ง อัตราการแช่เยือกแข็ง อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษา ประสิทธิภาพในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงโปรตีน และการออกซิเดชัน (Sikorski and Pan, 1994)



(a)



(b)

Figure 35. Changes in overall quality score of squid (a) and cuttlefish (b) frozen using air-blast and contact plate freezing methods during storage at -18°C for 6 months.

Bars represent the standard deviation from twelve determinations.

Significant effects of

- cephalopod samples on overall quality score ($p>0.05$)
- freezing methods on overall quality score ($p>0.05$)
- storage time on overall quality score ($p<0.05$)

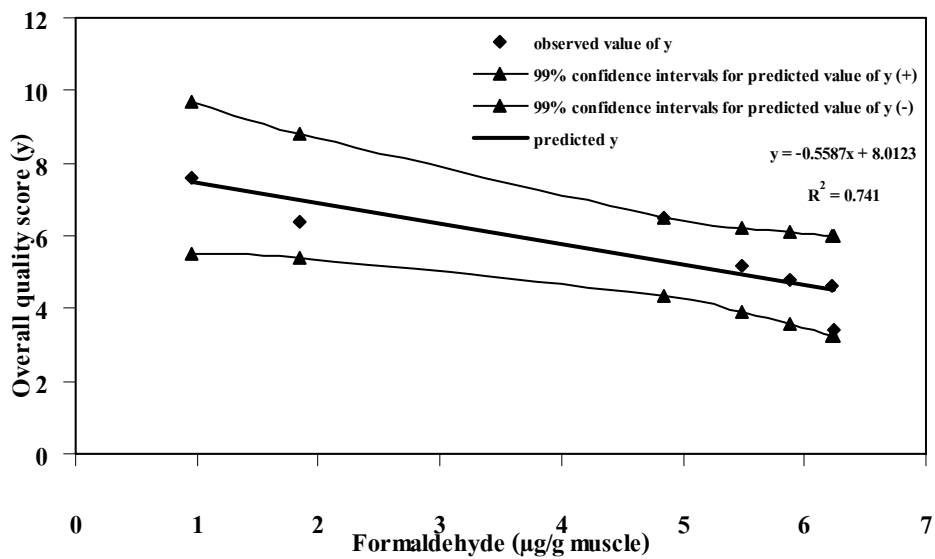
3.3.3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างผลการทดลองทางด้านประสาทสัมผัส จุลินทรีย์ ภายนอก และเคมีของหมึกกล้วยและหมึกกระดองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างผลการทดสอบคุณภาพโดยตรง ได้แก่ การทดสอบทางจุลินทรีย์ ภายนอกและเคมีกับการทดสอบคุณภาพโดยทางอ้อม ได้แก่ การทดสอบทางประสาทสัมผัสของหมึกกระดองและหมึกกล้วยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสแสดงดัง Table 16 การเปลี่ยนแปลงของค่า FA ค่าความสว่าง (L*) และปริมาณน้ำอิสระของหมึกกล้วย และค่า FA ค่าความสว่าง (L*) และ TBARS ของหมึกกระดองที่มีความสัมพันธ์ทางตรงกับค่า QIM และมีความสัมพันธ์ในทางตรงข้ามกับค่าคุณภาพโดยรวมโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) นอกจากนี้จาก Table 16 จะเห็นว่าค่า FA มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสำหรับหมึกทั้งสองชนิด เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าคุณภาพทางประสาทสัมผัส (คะแนนคุณภาพโดยรวมและ QIM) กับ FA ดัง Figure 36-39 จะเห็นว่ากราฟดังกล่าวมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) สูงอยู่ในช่วง 0.74 ถึง 0.93 และสามารถใช้ทำนายคุณภาพของหมึกทั้งสองชนิดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสได้ที่ระดับ α เท่ากับ 0.01

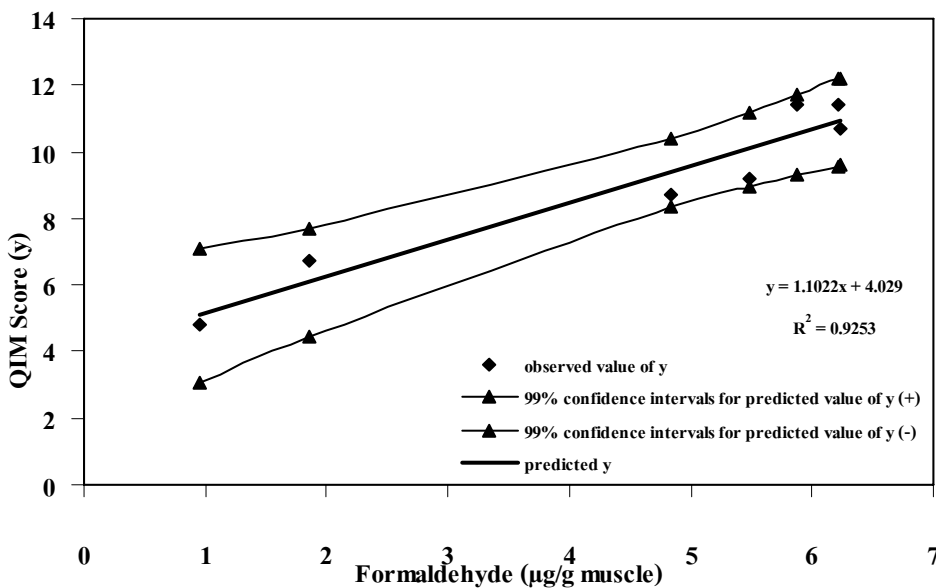
Table 16 Correlation coefficient between objective qualities and subjective of squid and cuttlefish frozen using different methods during frozen storage.

Analysis/Samples	squid				cuttlefish			
	QIM score		Overall quality score		QIM score		Overall quality score	
	Air-blast freezing	Contact plate freezing	Air-blast freezing	Contact plate freezing	Air-blast freezing	Contact plate freezing	Air-blast freezing	Contact plate freezing
Expressible drip	0.868*	0.570	-0.846*	-0.654*	0.675*	0.495	-0.799*	-0.533
Free drip	0.965*	0.705*	-0.923*	-0.737*	0.792*	0.502	-0.879*	-0.531
Cooking loss	0.562	0.605*	-0.588*	-0.637*	0.571*	0.624*	-0.715*	-0.657*
Texture	0.833*	-0.028	0.634*	-0.124	-0.417	-0.277	0.474	0.210
Color: L*	-0.727*	-0.816*	0.851*	0.822*	-0.753*	-0.838*	0.797*	0.873*
a*	0.575	0.596*	-0.713*	-0.516	0.680*	0.775*	-0.756*	-0.811*
b*	0.850*	0.691*	-0.835*	-0.778*	0.356	0.439	-0.424	-0.483
TBARS	0.634*	0.730*	-0.835*	-0.809*	0.818*	0.872*	-0.861*	-0.920*
Formaldehyde	0.952*	0.927*	-0.852*	-0.846*	0.930*	0.945*	-0.956*	-0.954*
Protein solubility:								
S1	-0.823*	-0.713*	0.786*	0.757*	-0.540	-0.614*	0.588*	0.653*
S2	0.783*	0.871*	-0.813*	-0.879*	-0.006	0.395	-0.053	-0.455
S3	0.546	0.735*	-0.675*	-0.716*	0.445	0.569*	-0.522	-0.600*
S4	0.605*	0.736*	-0.769*	-0.762*	0.572*	0.462	-0.604*	-0.493
pH	-0.495	-0.753*	0.601*	0.430	-0.582*	-0.564*	0.462	0.404
Psychrophilic count	0.627*	0.627*	-0.800*	-0.800*	-	-	-	-
Total viable count	0.457	0.457	-0.605*	-0.605*	-	-	-	-

Note: * =significant (p<0.01)

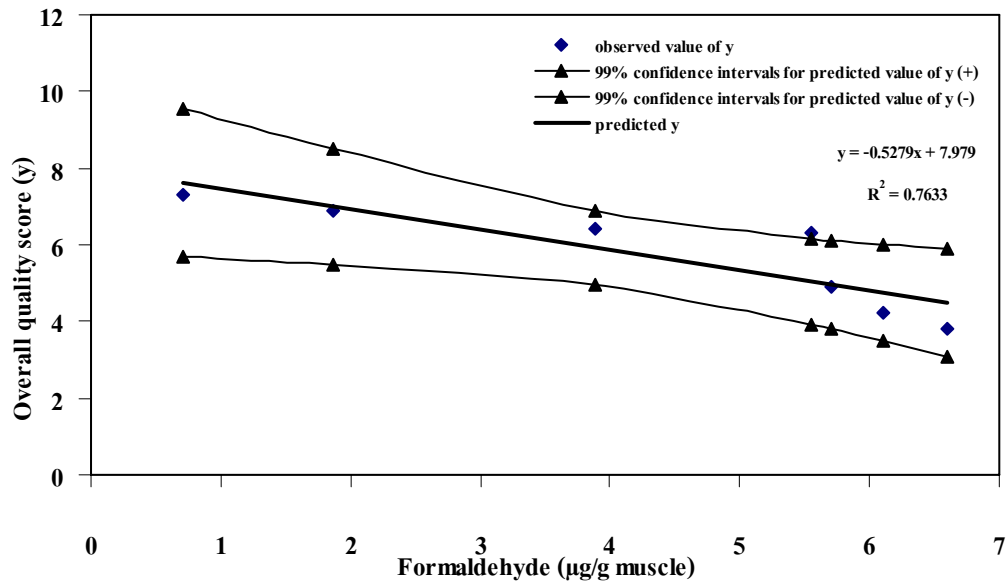


(a)

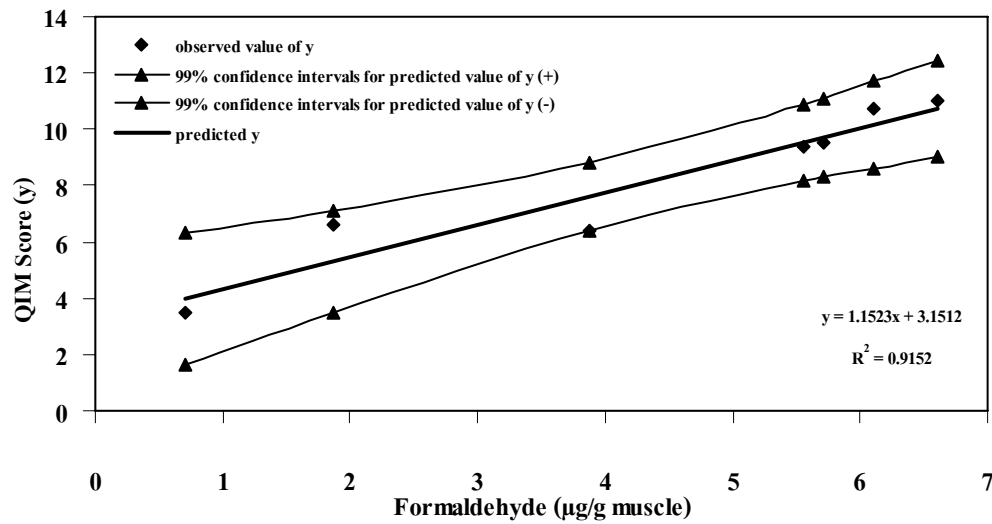


(b)

Figure 36. Correlation regression between sensory analysis (overall quality (a) and QIM (b)) and formaldehyde content of squid frozen using air-blast freezing during storage at -18°C for 6 months, at 99% confidence intervals.

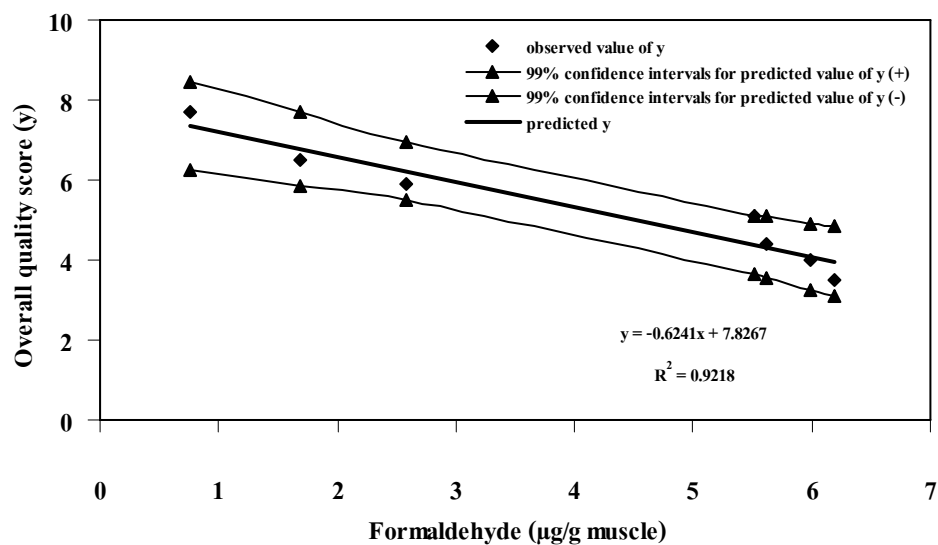


(a)

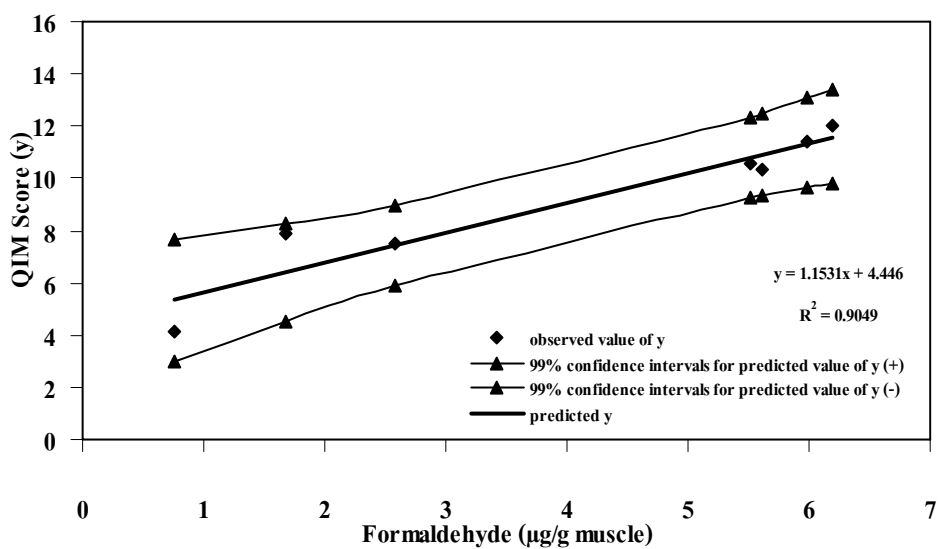


(b)

Figure 37. Correlation regression between sensory analysis (overall quality (a) and QIM (b)) and formaldehyde content of squid frozen using contact plate freezing during storage at -18°C for 6 months, at 99% confidence intervals.

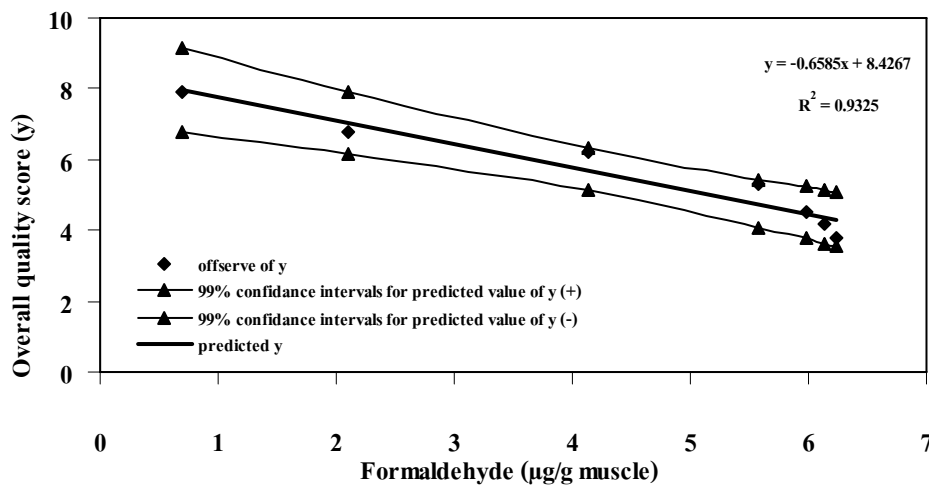


(a)

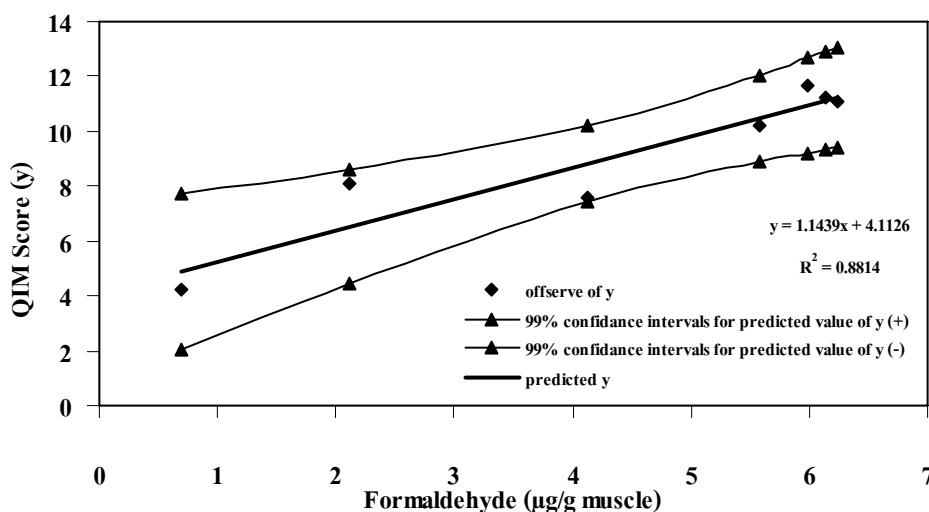


(b)

Figure 38. Correlation regression between sensory analysis (overall quality (a) and QIM (b)) and formaldehyde content of cuttlefish frozen using air-blast freezing during storage at -18°C for 6 months, at 99% confidence intervals.



(a)



(b)

Figure 39. Correlation regression between sensory analysis (overall quality (a) and QIM (b)) and formaldehyde content of cuttlefish frozen using contact plate freezing during storage at -18°C for 6 months, at 99% confidence intervals.

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

1. การศึกษาปัจจัยคุณภาพที่ใช้เป็นดัชนีความสดของหมึกกล้วย และหมึกกระดอง ที่เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง พบว่าหมึกกล้วย (*Photololigo duvaucelii*) และหมึกกระดอง (*Sepia aculeata*) มีอายุการเก็บรักษาในน้ำแข็ง 6 วัน จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยวิธีคุณภาพโดยรวม ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ตัวอย่างอยู่ในระดับคะแนนไม่ยอมรับ และถึงจุดที่ไม่สามารถบริโภคได้ (จุดปฏิเสธ) หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 14 วัน ค่าปริมาณของเหลวที่ออกจากกล้ามเนื้อ มีความสัมพันธ์ทางตรงกับค่า QIM และมีความสัมพันธ์ทางตรงข้ามกับค่าคุณภาพโดยรวม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) อยู่ในช่วง 0.81 ถึง 0.92 และค่าดังกล่าวสามารถใช้เป็นดัชนีที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบความสดของหมึกทั้งสองชนิดในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระดับ $\alpha = 0.01$

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนและโครงสร้างจุลภาคของเนื้อหมึกกระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง พบว่าหมึกทั้งสองมีเนื้อสัมผัสนุ่มขึ้นและมีค่าแรงเฉือนลดลง ($p < 0.05$) เมื่อเก็บรักษานานขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อและไมโอซินเส้นหนัก (MHC) ถูกย่อยสลาย

3. วิธีการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาที่ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือนส่งผลให้หมึกกล้วยและหมึกกระดองสูญเสียสภาพของโปรตีนเพิ่มขึ้น และเกิดการออกซิเดชันของไขมัน โดยการแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นมีการเปลี่ยนแปลงของการออกซิเดชันสูงกว่าการแช่เยือกแข็งแบบแผ่นสัมผัส จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส แสดงให้เห็นว่าลำตัวของหมึกทั้งสองชนิดมีคะแนนระดับไม่ยอมรับหลังเก็บรักษา 3 เดือน และมีคุณภาพไม่ถึงระดับปฏิเสธ หลังจากเก็บรักษา 6 เดือนการเปลี่ยนแปลงของค่าฟอร์มัลดีไฮด์มีความสัมพันธ์ทางตรงกับ QIM และทางตรงข้ามกับค่าคุณภาพโดยรวมมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ อยู่ในช่วง 0.74 ถึง 0.93 และสามารถใช้ในการทำนายคุณภาพของหมึกทั้งสองชนิดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือนได้ที่ระดับ α เท่ากับ 0.01

ข้อเสนอแนะ

การทดสอบทางประสาทสัมผัส QIM ที่ใช้ยังไม่เหมาะสมกับคุณลักษณะของหมึกกล้วย (*Photololigo duvaucelii*) และหมึกกระดอง (*Sepia aculeata*) ซึ่งคะแนนของ QIM เป็นคะแนนรวมของคุณภาพทางประสาทสัมผัสจะต้องมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำแข็ง และสามารถใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาได้ แต่สำหรับการทดลองนี้ ได้นำ QIM ที่ใช้การตรวจสอบความสดของหมึกกล้วย (*Illex coindetii*) (Vaz-Pires and Seixas, 2006) และหมึกกระดอง (*Sepia officinalis*) (Vaz-Pires and Seixas, 2006) มาใช้จึงทำให้กราฟคะแนนที่ได้ไม่เป็นเส้นตรงและคะแนนรวมของ QIM ในตัวอย่างที่ปฏิเสธไม่เท่ากับคะแนนสูงสุด (16 และ 17 สำหรับหมึกกล้วยและหมึกกระดอง ตามลำดับ) หากต้องการนำ QIM มาใช้สำหรับทำนายอายุการเก็บรักษาของหมึกกล้วย (*Photololigo duvaucelii*) และหมึกกระดอง (*Sepia aculeata*) ที่ใช้ในการวิจัยนี้จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในการปรับพารามิเตอร์ที่ไม่บ่งชี้คุณภาพของหมึกทั้งสองชนิดให้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของหมึกดังกล่าว เช่น การติดกันของกระดุกและหัวของหมึกกระดอง หรือการเพิ่มพารามิเตอร์ที่จำเป็นในการตรวจสอบ เช่น ความสมบูรณ์ของผิวหนัง และการข้อมติคืบบนกล้ามเนื้อ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2552. หมึก "อาหารคุณภาพสำหรับมนุษย์" (ออนไลน์). สืบค้นจาก:

<http://www.fisheries.go.th/marine/KnowledgeCenter/Paper/paper01> (6 มกราคม 2553)

กรมประมง. 2550. คู่มือการจำแนกหมึกครอบครัว Loliginidae ภาคสนาม (ออนไลน์). สืบค้น

จาก: <http://www.fisheries.go.th/marine/MTI/%CA%D4%A7%CB%D2%A4%C150.pdf>

(6 มกราคม 2553)

กองควบคุมตรวจสอบผลิตภัณฑ์และการแปรรูปสัตว์น้ำ. 2542. มาตรฐานสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำของประเทศผู้นำเข้าผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. เอกสารประกอบการตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำเพื่อการส่งออก.

ตรี วาทกิจ. 2552. เอกสารประกอบการสอนวิชา 2501-2304 ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีนครพนม มหาวิทยาลัยนครพนม. นครพนม.

มีทนา แสงจินดาวงษ์. 2548. ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถานีประมงทะเล จังหวัดสตูล. 2553. สัตว์ทะเลเศรษฐกิจที่พบในน่านน้ำจังหวัดสตูลและบริเวณใกล้เคียง (ออนไลน์). สืบค้นจาก:

<http://www.satundof.satunprovince.net/economicfish2.html> (6 มกราคม 2553)

สถาบันอาหาร. 2543. ผลิตภัณฑ์ประมง (ออนไลน์). สืบค้นจาก:

http://www.nfi.or.th/publication/food_insight/fish_2.pdf (6 มกราคม 2553)

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548. เคมี่และคุณภาพสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2548. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

(มกอช.7005-2548). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม

- อำพร เลาวพงษ์. 2552. รายงานสถานการณ์หมึกไตรมาสต์ที่ 1 ปี 2552 (ออนไลน์). สืบค้นจาก:
<http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/Squid%20Q111July09.htm> (7 มกราคม 2553)
- Amano, K. and Yamada, K. 1964. A biological formation of FA in the muscle tissue of gadoid fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 30: 430-435.
- An, H., Hurtado, J.L., Borderias, J. and Montero, P. 1998. Charecterization of proteolytic activity in octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. *J. Food Biochem*. 23: 469-483.
- Ando, M., Ando, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y. and Miyoshi, M. 1999. Muscle firmness and structure of raw and cooked arrow squid mantle as affected by freshness. *J. Food Sci*. 64: 659-662.
- Aubourg, S.P. and Medina, I. 1999. Influence of storage time and temperature on lipid deterioration during cod (*Gadus morhua*) and headdock (*Melanogrammus aeglefinus*) frozen storage. *J. Sci. Food and Agric*. 79:1943-1948.
- Barbosa, A. and Vaz-Pires, P. 2004. Quality index method (QIM): development of a sensorial scheme for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Food Control*. 15: 161-168.
- Ben-Gigirey, B., Vieites, J.M., Villa, T.G. and Barros-Velazquez, J. 1999. Chemical changes and visual appearance of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) as related to frozen storage. *J. Food Sci*. 64: 20-24.
- Benjakul, S. and Bauer, F. 2001. Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze-thaw cycles. *J. Sci. Food Agric*. 80:1143-1150.
- Benjakul, S. and Sutthipan, N. 2009. Muscle changes in hard and soft shell crabs during frozen storage. *LWT Food Sci. Technol*. 42: 723-729.

- Benjakul, S., Visessanguan, W., Thongkaew, C. and Tanaka, M. 2003. Comparative study on physical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage. *Food Res. Int.* 36: 787-795.
- Boonsumrej, S., Chaiwanichsiri, S., Tantratian, S., Suzuki, T. and Takai, R. 2007. Effect of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. *J. Food Eng.* 80: 292-299.
- Buege, J.A. and Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 2: 32-34.
- Buttkus, H. 1970. Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. *J. Food Sci.* 35: 558-562.
- Careche, M., Del Mazo, M.L., Torrejon, P. and Tejada, M. 1998. Importance of frozen storage temperature in the type of aggregation of myofibrillar proteins in cod (*Gadus morhua*) fillets. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1539-1546.
- Careche, M. and Li-Chen, E. 1997. Structural changes and Raman spectroscopic studies of cod myosin upon modification with formaldehyde or frozen storage. *J. Food Sci.* 62: 717-723.
- Chawla, S.P., Venugopal, V. And Nair, P.M. 1996. Gelation of proteins from washed muscle of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) under mild acidic conditions. *J. Food Sci.* 61: 362-371.
- Civera, T., Grassi, M.A. and Pattono, D. 1999. Caratteristiche chimiche e microbiologiche di molluschi cefalopodi nel corso della conservazione. *Industrie Alimentari.* 38: 933-937.

- Daias, J., Nunes, M.L. and Mendes, R. 1994. Effect of frozen storage on the chemical and physical properties of black and silver scabbard fish. *J. Sci. Food Agric.* 66: 327-335.
- Decker, E.A. and Hultin, O.H. 1992. Lipid oxidation in muscle food via redox: Iron. *In Lipid Oxidation in Food.* (Angelo, A.S., ed.). p. 33-54. American Chemical Society. Washington D.C.
- Declair, W., Vlaemink, A., Geladi, P. And Grieken, R. 1987. Determination of protein-bound copper and zinc in some organ of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 60:347-350.
- Dublán-Garcia, O., Cruz-Camarillo, R., Guerrero-Legarreta, I. and Ponce-Alquicira, E. 2005. Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *J. Muscle Foods.* 17: 219-310.
- Ebina, H., Nagashima, Y., Ishizaki, S. and Taguchi, T. 1995. Myosin heavy chain-degrading proteinase from spear squid muscle. *Food Res. Int.* 28: 31-36.
- Edith, P.A. 2004. Flavor of frozen of frozen foods. *In Handbook of Frozen Foods.* (Hui, Y.H., Cornillon, P., Legaretta, I.G., Lim, M.H., Murrell, K.D. and Nip, W.K. eds.). p. 239-262. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Erickson, M. 1997. Lipid oxidation: flavor and nutritional quality deterioration in frozen foods. *In Quality in Frozen Food.* (Erickson, M. and Hung, Y.C. eds). Chapman and Hall. New York, p. 141-173.
- Erickson, M. and Hung, Y.C. 1997. *Quality in Frozen Food.* Chapman and Hall. New York.

- Falandysz, J. 1991. Concentrations of trace metals in various tissues of the squid *Loligo opalescens* and their redistribution after canning. *J. Sci. Food Agric.* 54: 79-87.
- George, R.M. 1997. Freezing systems. *In Quality in Frozen Food.* (Erickson, M. and Hung, Y.C., eds.). p.3-9. Chapman and Hall. New York.
- Golden, D.A. and Arroyo-Gallyoun, L. 1997. Relationship of frozen-food quality to microbial survival. *In Quality in Frozen Food.* (Erickson, M. and Hung, Y.C. eds.). p. 174-193. Chapman and Hall. New York.
- Gonçalves, A.A. and Gindri Junior, C.S.G. 2009. The effect of glaze uptake on storage quality of frozen shrimp. *J. Food Eng.* 90: 285-290.
- Gram, L. and Huss, H.H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 121-137.
- Hamre, K., Lie, O., Sandnes, K. 2003. Development of lipid oxidation and flesh colour in frozen stored fillets of Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.): effects of treatment with ascorbic acid. *Food Chem.* 82: 445-453.
- Hanabe, M., Kousu, S., Okada, Y. and Sugiyama, M. 1989. Utilization of Squid. Company Limited. Tokyo.
- Harris, P. and Tall, J. 1994. Rancidity in fish. *In Rancidity in Foods.* (Allen, J.C. and Hamilton, R.J., eds.). p. 256-272. Chapman and Hall. London.
- Hasegawa, H. 1987. Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish Products. Marine Fisheries Research Department. SEAFDEC: Singapore.

- Hatae, K., Tobimatsu, A., Takeyama, M. and Matsumoto, J.J. 1986. Contribution of connective tissues on the texture difference of various fish species. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 52: 2001-2007.
- Hebard, C.E., Flick, G.J. and Martin, R.E. 1982. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. *In Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products.* (Martin, R.E., Flick, G.J. and Ward, D.R., eds.). p. 149-304. AVI Publishing Company. New York.
- Helbing, D.E. and VanBriesen, J.M. 2007. Free chlorine demand and cell survival of microbial suspensions. *Water Res.* 41: 4424-4434.
- Hinck, M.J. and Stanley, D.W. 1985. Colour measurement of the squid (*Illex illecebrosus*) and its relationship to quality and chromatophore ultrastructure. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.* 18: 233-241.
- Hui, Y.H., Cornillon, P., Legarreta, I.G., Lim, M., Murrell, K.D. and Nip, W.K. 2004. *Handbook of Frozen Foods.* Marcel Dekker Incorporated. New York.
- Hurtado, J.L., Borderías, J., Montero, P. and An, H. 1999. Characterization of proteolytic activity in octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. *J. Food Biochem.* 23: 469-483.
- Huss, H.H., Dalgaard, P. and Gram, L. 1997. Microbiology of fish and fish products. *In Seafood from Producer to Consumer Integrated Approach to Quality.* (Luten, J.B., Børresen, T. and Oehlenschläger J., eds.). p. 413-430. Elsevier. Amsterdam.
- Hyldig, G., Jørgensen, B., Kristbergsson, K., Martinsdottir, E. and Sveinsdottir, K. 2002. Quality index method (QIM) scheme developed for farmed atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Qual. Preference.* 14: 237-245.

- Iida, H., Nakamura, K. and Tokunaga, T. 1992. Non-protein nitrogenous compounds in muscle extract of oceanic cephalopods. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 58: 2383-2390.
- Jatuphong, V., Barbosa-canovas, G. and Swanson, B.G. 2000. The influence of temperature on functional properties of high hydrostatic pressure surimi gel. *In Innovations in Food Processing*. (Barbosa-Canovas, G.V. and Gould, G.W., eds) p. 111-122. Technomic Publishing Co. Inc. New York.
- Jiang, S.T. and Lee, T.C. 2004. Freezing seafood and seafood products: principles and applications. *In Handbook of Frozen Foods*. (Hui, Y.H., Cornillan, P., Legaretta, I.G., Lim, M.H., Mumell, K.D. and Nip, W.K. eds.). p. 245-262. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kagawa, M., Matsumoto, M., Yoneda, C., Mitsuhashi, T. and Hatae, K. 2002. Changes in meat texture of three varieties of squid in the early stage of cold storage. *Fisheries Sci*. 68: 783-792.
- Ke, P.J., Burns, B.G. and Woyewoda, A.D. 1984. Recommended procedures and guidelines for quality evaluation of atlantic short-fin squid (*Illex illecebrosus*). *Lebensm. Wiss. Technol*. 17: 276-281.
- Kijowski, J. 2001. Muscle protein. *In Chemical and Functional Properties of Food Proteins*. (Sikorski, Z.E., ed.). p. 233-269. Technomic Publishing Co. Inc. New York.
- Kugino, M. and Kugino, K. 1994. Microstructural and rheological properties of cooked squid mantle. *J. Food Sci*. 59: 792-796.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

- Lagerstedt, Å., Enfält, L., Johansson, L. and Lundström, 2008. Effect of freezing on sensory quality, shear force and water loss in beef *M. longissimus dorsi*. *Meat Sci.* 80: 457-461.
- Lakshmanan, P.T., Varma, P.R.G. and Iyer, T.S.G. 1993. Quality of commercially frozen cephalopod products from India. *Food Control.* 4: 159-164.
- Lapa-Guimarães, J., Contreras, E., Eduardo de Felicio, P. and Aparecida, M. 2002. Sensory, colour and psychrotrophic bacterial analyses of squids (*Loligo plei*) during storage in ice. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35: 21-29.
- Lapa-Guimarães, J., Eduardo de Felicio, P. and Guzman, E.S.C. 2005. Chemical and microbial analyses of squid muscle (*Loligo plei*) during storage in ice. *Food Chem.* 91: 477-483.
- Lawless, H.T. and Heymann, H. 1999. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices.* p. 567-569. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg.
- LeBlanc, R.J. and Gill, T.A. 1984. Ammonia as an objective quality index in squid. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 17: 195–201.
- Leelapongwattana, K., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Howell, N. 2005. Physicochemical and biochemical changes in whole lizardfish (*Saurida micropectoralis*) muscles and fillets during frozen storage. *J. Food Biochem.* 29: 547-569.
- Licciardello, J.J. 1990. Freezing. *In The Seafood Industry.* (Martin, R.E. and Flick, G., eds.). p. 205-218. An Osprey Book. New York.
- Li, J., Zhu, J. and Ye, L. 2007. Determination of formaldehyde in squid by high performance liquid chromatography. *Asia Pac. J. Clin. Nat.* 16: 127-130.

- Llorca, E., Hernando, I., Pérez-Munuera, I., Quiles, A., Larrea, V. and Lluch, M.Á. 2007. Protein breakdown during the preparation of frozen batter-coated squid rings. *Eur. Food Res. Technol.* 225: 807-813.
- Lopkulkiaert, W., Prapatsornwattana, K. and Rungsardthong, V. 2009. Effect of sodium bicarbonate containing traces of citric acid in combination with sodium chloride on yield and some properties of white shrimp (*Penaeus vannamei*) frozen by shelf freezing, air-blast and cryogenic freezing. *LWT Food Sci. Technol.* 42: 768-776.
- MacDonald, G.A. and Lanier, T. 1991. Carbohydrates protect proteins from the denaturing effects of freezing and frozen storage by at least two mechanisms. *Food Tech.* 45(3): 150-158.
- Makri, M. 2009. Biochemical and textural properties of frozen stored (-22°C) gilthead seabream (*Sparus aurata*) fillets. *African J. Biotech.* 8: 1287-1299.
- Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. 1999. *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press LLC. Boca Raton.
- Morales, J., Montero, P., and Moral, A. 2000. Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2142-2148.
- Moral, A., Morales, J., Ruíz-Capillas, C. And Montero, P. 2002. Muscle protein solubility of some cephalopods (pota and octopus) during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 82: 663-668.
- Morrissey, M.T., Wu, J.W., Lin, D.D. and An, H. 1993. Protease inhibitor effects on torsion measurements and autolysis of Pacific whiting surimi. *J. Food Sci.* 58: 1050-1054.
- Nagashima, Y., Ebina, H., Nakai, T., Tanaka, M. and Taguchi, T. 1992. Proteolysis affects thermal gelation of squid mantle muscle. *J. Food Sci.* 57: 916-922.

- Nash, T. 1953. Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416-421.
- Nawar, W.W. 1996. Lipid. *In Food Chemistry*. p. 275. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Ngapo, T.M., Babare, I.H., Reynolds, J. and Mawson, R.F. 1999. Freezing and thawing rate effect on drip loss from samples of pork. *Meat Sci.* 53: 149-158.
- Ochiai, Y., Kariya, Y., Watabe, S. And Hashimoto, K. 1985. Heat-induced tendering of turban shell (*Batillus cornutus*) muscle. *J. Food Sci.* 50: 981-984.
- Ohashi, E., Okamoto, M., Ozawa, A. and Fugita, T. 1991. Characterization of common squid using several freshness indicators. *J. Food Sci.* 56: 161-163.
- Okuzumi, M. and Fujii, T. 2000. Nutritional and Functional Properties of Squid and Cuttlefish. National Cooperative Association of Squid Processors. Tokyo.
- Olaechea, R.P., Ushio, H., Watabe, S., Takada, K. and Hatae, K. 1993. Toughness and collagen content of abalone muscles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 6-11.
- Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, P., Dalgaard, P., Jensen, B. and Undeland, I. 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 258-265.
- Otwell, W.S. and Hamann, D.D. 1979. Textural characterization of squid (*Loligo pealei* Lesuer): scanning electron microscopy of cooked mantle. *J. Food Sci.* 44: 1629-1635.
- Paarup, T., Sanchez, J.A., Moral, A., Christensen, H., Bisgaard, M. and Gram, L. 2002. Sensory, chemical and bacteriological changes during storage of iced squid (*Todaropsis eblanae*). *J. Appl. Microbiol.* 92: 914-950.

- Pan, B.S. and Yeh, W.T. 1993. Biochemical and morphological changes in grass shrimp (*Penaeus monodon*) muscle following freezing by air blast and liquid nitrogen methods. *J. Food Biochem.* 17: 147-160.
- Parkin, K.L. and Hultin, H.O. 1982. Some factors influencing the production of dimethylamine and formaldehyde in minced and intact red hake muscle. *J. Food Process. Preserv.* 6: 73-97.
- Parris, N. and Foglin, T.A. 1983. Simplified alcoholic extraction procedure for ammonia in meat tissue. *J. Agric. Food Chem.* 31: 887-889.
- Prafulla, V., Francis, L. and Lakshmanan, P.T. 2001. Concentrations of trace metals in the squids, *Loligo duvauceli* and *Doryteuthis sibogae* caught from the southwest coast of india. *Asian Fish. Sci.* 14: 399-410.
- Ramirez-Suarez, J.C., Ibrarra-León, L.R., Pacheco-Aguilar, R. Lugo-Sánchez, M.E. García-Sánchez, G. and Carvallo-Ruiz, G. 2008. Physicochemical and functional changes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle during ice storage. *Food Chem.* 111: 586-591.
- Rees, D.G. 1995. *Essential Statistics*. p. 174-181. Chapman and Hall. London.
- Richard E. Young, Michael Vecchione, and Katharina M. Mangold. 2003. Cephalopod Chromatophores (online). Available http://tolweb.org/accessory/Cephalopod_Chromatophore?acc_id=2038#AboutThisPage (9 November 2007)
- Rodger, G., Weddle, R.B., Craig, P. and Hastings, R. 1984. Effect of alkaline protease activity on some properties of comminuted squid. *J. Food Sci.* 49: 117-119.

- Ruiz-Capillas, C., Moral, A., Morales, J. and Montero, P. 2002. Characterisation of non-protein nitrogen in the cephalopods volador (*Illex coindetii*) pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrhosa*). *Food Chem.* 76: 165-172.
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M. and Shimizu, Y. 1986. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 52: 1595-1600.
- Siddaiah, D., Sagarreddy, G.V., Raju, C.V. and Chandrasekhar, T.C. 2001. Changes in lipids proteins and kamaboko forming ability of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) mince during frozen storage. *Food Res. Int.* 34: 47-53.
- Sigurgisladottir, S., Ingvarsdottir, H., Torrissen, O.J., Cardinal, M. and Hafsteinsson, H. 2000. Effect of freezing/thawing on the microstructure and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmon salar*). *Food Res. Int.* 33: 857-865.
- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. and Sun Pan, B. 1990. The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. *In Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation.* (Sikorski, Z.E. ed.). p. 29-54. CRC Press, Inc. Boca Raton.
- Sikorski, Z.E. and Pan, B.S. 1994. Preservation of seafood quality. *In Seafoods Chemistry, Processing Technology and Quality.* (Shahidi, F. and Botta, J.R. eds.). p. 179-183. Blakie academic Professional, Glasgow.
- Sista, R.V., Erickson, M.C. and Shewfelt, R.L. Quality deterioration in frozen foods associated with hydrolytic enzyme activities. *In Quality in Frozen Food.* (Erickson, M. and Hung, Y.C., eds.). p.101-108. Chapman and Hall. New York.
- Sotelo, G.C., Piñeiro, C. and Pérez-Martin, R.I. 1995. Denaturation of fish proteins during frozen storage: role of formaldehyde. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* 200: 14-23.

- Speck, M.L. 1976. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. American Public Health Association, Inc. Washington, D.C.
- Sriket, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kijroongrajana, K. 2007. Comparative studies on the effect of the freeze-thawing process on the physicochemical properties and microstructures of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) muscle. Food Chem. 104: 113-121.
- Stanley, D.W. and Hultin, H.O. 1982. Quality factors in cooked north atlantic squid. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 15: 277-282.
- Stone, H. and Sidel, J.L. 1993. Sensory Evaluation Practices. 2nd ed. Academic Press. San Diego.
- Tejada, M., Mohamed, G.F. and Huidobro, A. 2002. Addition of sardine to hake minces and subsequent effect on dimethylamine and formaldehyde formation. J. Sci. Food Agric. 82: 351-359.
- Thanonkaew, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W. and Decker, E.A. 2005. Lipid oxidation in microsomal fraction of squid muscle (*Loligo peali*). J. Food Sci. 70: 478-482.
- Thanonkaew, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2006a. Chemical composition and thermal property of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle. J. Food Comp. Anal. 19: 127-133.
- Thanonkaew, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W. and Decker, E.A. 2006b. Development of yellow pigmentation in squid (*Loligo peali*) as a result of lipid oxidation. J. Agric. Food Chem. 54: 956-962.
- Thanonkaew, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W. and Decker, E.A. 2006c. The effect of metal ions on lipid oxidation colour and physicochemical properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) subjected to multiple freeze-thaw cycles. Food Chem. 95: 591-599.

- Thanonkaew, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W. and Decker, E.A. 2007. Yellow discoloration of liposome system of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) as influenced by lipid oxidation. *Food Chem.* 102: 219-224.
- Thanonkaew, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W. and Decker, E.A. 2008. The effect of antioxidants on the quality changes of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle during frozen storage. *J. Food Sci. Tech.* 41: 161-169.
- Thongkaew, C. 2003. Improvement of quality of surimi produced from frozen fish. M.D. Prince of Songkla University. Songkhla.
- Tsuchiya, T., Yamada, N. and Matsumoto, J.J. 1978. Extraction and purification of squid myosin. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 44: 175-179.
- Ueng, Y.E. and Chow, C.J. 1998. Textural and histological changes of different squid mantle muscle during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4728-4733.
- U.S. Food and Drug Administration. 2005. Frozen shrimp sensory evaluation short course. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).
- Vaz-pires, P. and Barbosa, A. 2004. Sensory, microbiological, physical and nutritional properties of iced whole common octopus (*Octopus vulgaris*). *Lebensm. Wiss. Technol.* 37: 105-114.
- Vaz-Pires, P. and Seixas, P. 2006. Development of new quality index method (QIM) schemes for cuttlefish (*Sepia officinalis*) and broadtail shortfin squid (*Illex coindetii*). *Food Control.* 17: 942-949.

- Vaz-Pires, P. and Seixas, P., Mota, M., Lapa-Guimarães, J., Pickova, J., Lindo, A. and Silva, T. 2008. Sensory, microbiological, physical and chemical properties of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and broadtail shortfin squid (*Illex coindetii*) stored in ice. *LWT Food Sci. Technol.* 41: 1655-1664.
- Virto, R., Mañas, P., Álvarez, I., Condon, S. and Raso, J. 2005. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5022-5028.
- Wikipedia (online). 2004. Available www.answers.com/topic/cuttlefish-png (7 December 2007)
- Xiong, Y.L. 1997. Protein determination and functionality losses. *In* Quality in Frozen Food. (Erickson, M. and Hung, Y.C., eds.). p.111-134. Chapman and Hall. New York.
- Yamanaka, H., Shiomi, K. and Kikuchi, J. 1987. Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). *J. Food Sci.* 52: 936-938.
- Zayas, J.F. 1997. Water holding capacity of proteins. *In* Functionality of Proteins in Food. p. 77, 81-84. Springer-Verlag. Berlin.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางเคมี

ก1 การวิเคราะห์หาปริมาณค่าที่ระเหยได้ (TVB-N) และไตรเมทิลเอมีน (TMA-N) โดยวิธี

Conway unit (Hasegawa, 1987)

อุปกรณ์

1. จานคอนเวย์
2. ไมโครบิวเรต
3. กระจกทรง

สารเคมี

1. Mixed indicator : ละลายโบรโมครีซอลกรีน 0.01 กรัม และเมทิลเรด 0.02 กรัม ด้วยเอทานอล แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร
2. Inner ring solution : ละลายกรดบอริก 10 กรัม ในเอทานอล 200 มิลลิลิตร แล้วเติม mixed indicator (จากข้อ 1) 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น
3. ละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล
4. สารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว : ละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) 60 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ต้มนาน 10 นาที ทำให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง
5. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 4 : ละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก (CCl_3COOH) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร
6. สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์อิสระเข้มข้นร้อยละ 10 : เติมแมกนีเซียมคาร์บอเนต ($MgCO_3$) 10 กรัม ลงใน 100 มิลลิลิตร ของฟอร์มาลิน (Formalin) (สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์อิสระเข้มข้นร้อยละ 35) เขย่าให้เข้ากันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองทำให้เจือจาง 3 เท่าด้วยน้ำกลั่น
7. วาสลิน

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณ 8 มิลลิลิตร โฮโมจิไนส์ให้ละเอียด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร (เก็บตัวอย่างในน้ำแข็งขณะใช้)

การหาปริมาณค่าที่ระเหยได้ (TVB-N)

1. ทาวาสลีนที่ขอบฝาจานคอนเวย์
2. คูณสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในวงกลมชั้นนอกของจานคอนเวย์
3. คูณ Inner ring solution 1 มิลลิลิตร ลงในวงกลมชั้นในของจานคอนเวย์
4. คูณสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอก แต่ให้อยู่คนและด้านกับสารละลายตัวอย่างที่ใส่ในข้อ 2
5. ปิดฝาจานคอนเวย์ให้สนิท
6. เอียงหรือหมุนจานคอนเวย์เบาๆ ให้สายละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว ผสมกับสารละลายตัวอย่าง ระวังอย่าให้เกิดการผสมกับ Inner ring solution ที่วงกลมชั้นใน
7. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45-60 นาที หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง
8. เปิดฝาจานคอนเวย์ แล้วไตรเตรทวงกลมชั้นใน ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสีเขียวจางหายไป จดปริมาตรกรดไว้คำนวณ
9. ทำ blank โดยใช้สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{TVB-N (มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม ตัวอย่าง)} = \frac{(N)(14)(A-B)(V)(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

โดยที่ N = Normality ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตรเตรท

A = มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตรเตรทตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตรเตรท blank

V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและสารละลายของกรดไตรคลอโรอะซิติก ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

การหาปริมาณไตรเมทิลเอมีน (TMA-N)

1. ทำเช่นเดียวกับการหา TVB-N ข้อ 1-3
2. เติม 1 มิลลิลิตรของสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์อิสระเข้มข้นร้อยละ 10 ผสมกับตัวอย่าง
3. ปิดฝาทันทีแล้วค่อยๆ เอียงหรือหมุนเบาๆ ให้สารละลายชั้นนอกผสมกัน
4. คูณสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอก ปิดฝาลงแล้วค่อยๆ หมุนจานคอนเวย์
5. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

6. เปิดฝาจานคอนเวย์ แล้วไตรเตรทวงกลมชั้นใน ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู จดปริมาตรกรดไว้คำนวณ
7. ทำ blank โดยใช้สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 1 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{TMA-N (มิลลิกรัม ใน โตรเจน/100 กรัม ตัวอย่าง)} = \frac{(N)(14)(C-B)(V)(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

โดยที่ N = Normality ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตรเตรท
 A = มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตรเตรทตัวอย่าง
 B = มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตรเตรท blank
 V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและสารละลายของกรดไตรคลอโรอะซิติก ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

ก2 การวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ตามวิธีการทดสอบของ Nash (1953)

สารเคมี

1. Acetylacetone reagent (Nash's reagent)
 ละลาย 150 กรัม แอมโมเนียมอะซิเตรท ในกรดอะซิติก 3 มิลลิลิตร และอะซิติกอะซิโตน 2 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
2. สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์อิสระมาตรฐาน
 ปิเปตสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์อิสระเข้มข้นร้อยละ 35 ปริมาณ 0.285 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1000 ppm และเจือจางความเข้มข้นเป็น 10 ppm ก่อนใช้สำหรับการเตรียมกราฟมาตรฐาน

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ในปิเปกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และโซโมจิโนซ์ให้ละเอียด

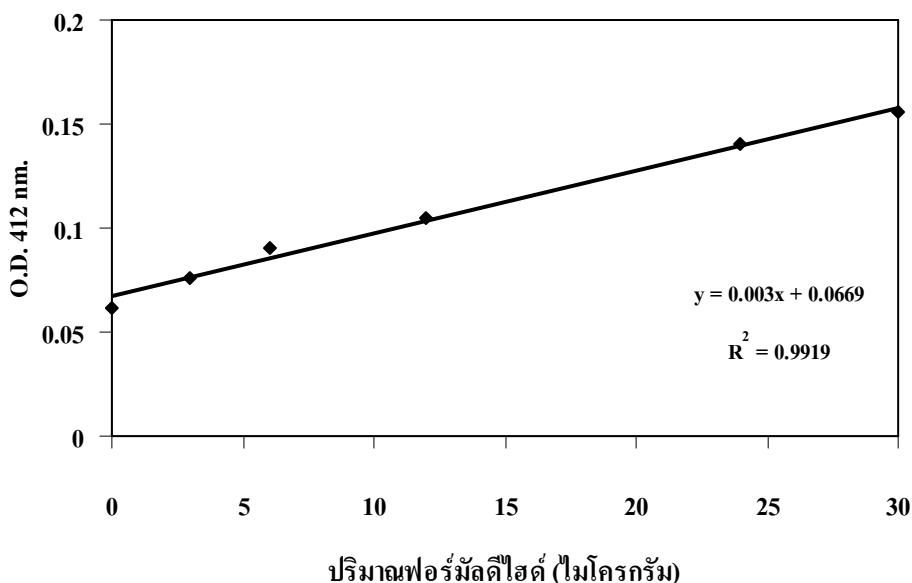
3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที
4. กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41
5. เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่ผ่านการสกัดโซโมจีเนสแล้วกรองอีกครั้งหนึ่ง รวมส่วนใส่ทั้ง 2 ครั้งเข้าด้วยกัน
6. ปรับพีเอชของสารละลายให้มีค่าประมาณ 6.0-6.5 โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล หรือ 0.1 นอร์มอล แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การตรวจสอบฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม Acetylacetone reagent ปริมาณ 3 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน
2. แช่สารละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
3. ทำให้สารละลายเย็นโดยให้น้ำไหลผ่าน
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร (เตรียม blank โดยใช้ น้ำกลั่น แทนสารละลายตัวอย่าง)

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์อิสระมาตรฐานเข้มข้น 10 ppm ปริมาณ 0, 0.3, 0.6, 1.2 และ 2.4 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองโดยใช้ไมโครปิเปต ซึ่งให้สารละลายที่มีเนื้อสารเท่ากับ 0, 3, 6, 12 และ 24 ไมโครกรัม ตามลำดับ
2. เติมน้ำกลั่น 3, 2.7, 2.4, 1.8 และ 0.6 มิลลิลิตร ตามลำดับแล้วเติม Acetylacetone reagent ปริมาณ 3 มิลลิลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 2
3. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ



การคำนวณ

$$\text{ฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ (ไมโครกรัมต่อกรัม)} = \frac{(A)(\text{ปริมาตรรวมทั้งหมดของสารสกัด})}{(\text{ปริมาตรของสารสกัดที่ใช้})(\text{น้ำหนักตัวอย่าง})}$$

โดย A = ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระจากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัม)

ก3 การตรวจสอบค่า Thiobabituric acid-reaction substance (TBARS) (Buege and Aust, 1978)

สารเคมี

1. TBA solution : ละลาย Thiobabituric acid (TBA) 1.875 กรัม และกรดไตรคลอโรอะซีติก 75 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มอล 10.45 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร
2. Blank solution : ละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 75 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มอล 10.45 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

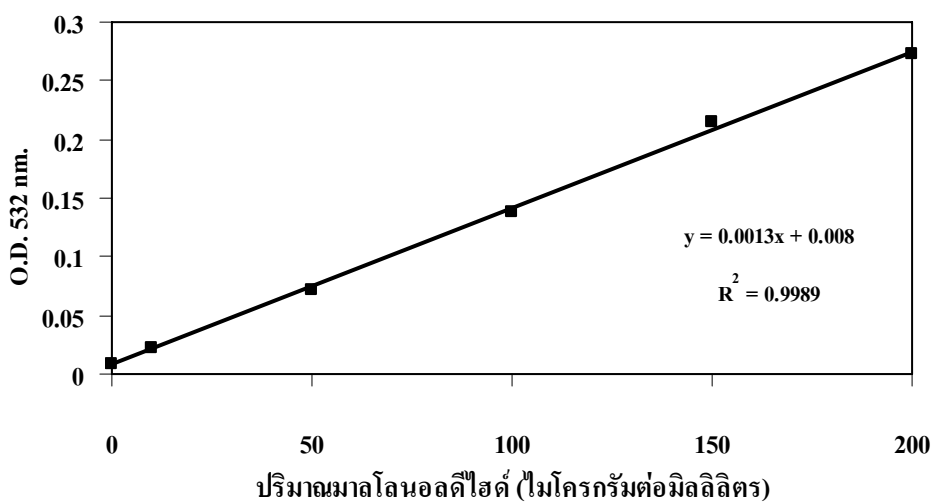
วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม เติม TBA solution 2.5 มิลลิลิตร โฮโมจีไนซ์นาน 1 นาที
2. นำมาต้มในน้ำเดือด (95-100 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที ทำให้เย็น

3. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,600 รอบ นาน 25 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานมาลาโลนอลดีไฮด์
4. ทำ blank โดยการใช้อย่างผสมกับ blank solution แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ดูดสารละลายมาลาโลนอลดีไฮด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0 10 50 100 150 และ 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ไมโครลิตร
2. นำสารละลายมาลาโลนอลดีไฮด์จากข้อ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาหาค่า TBARS เช่นเดียวกับตัวอย่าง
3. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาลาโลนอลดีไฮด์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานมาลาโลนอลดีไฮด์



ก4 การตรวจสอบ TCA-soluble peptide (Morrissey *et al.*, 1993)

สารเคมี

1. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 5 : ละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก (CCl_3COOH) 50 กรัม ในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร
2. สารละลาย A: โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียม

ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

3. สารละลาย B: คอปเปอร์ซัลเฟตร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมซิติเรทเข้มข้น ร้อยละ 1
4. สารละลาย C: สารละลายโฟลินฟินอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) เข้มข้น 2 นอร์มอล โดยการนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น (1ต่อ1) ก่อนใช้
5. สารละลาย D: นำสารละลาย B จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย A จำนวน 50 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 3 กรัม ใส่ลงในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร
2. นำมาโฮโมจีไนส์ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
3. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000g เป็นเวลา 20 นาที
4. นำไปวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายโดยวิธี Lowry method (Lowry *et al.*, 1951)

ก5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย A: โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย B: คอปเปอร์ซัลเฟตร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมซิติเรทเข้มข้นร้อยละ 1
3. สารละลาย C: สารละลายโฟลินฟินอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) เข้มข้น 2 นอร์มอล โดยการนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น (1ต่อ1) ก่อนใช้
4. สารละลาย D: นำสารละลาย B จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย A จำนวน 50 มิลลิลิตร

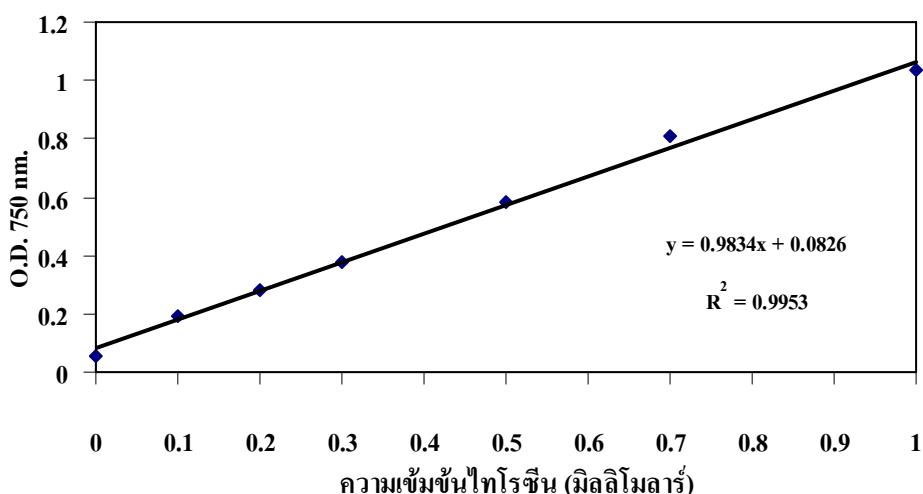
วิธีการ

1. นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย D จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
2. เติมสารละลาย C 200 ไมโครลิตร ลงไปในสารละลายผสมข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

- นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

- ดูดสารละลายไทโรซีนเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 0 20 40 60 100 140 และ 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 ไมโครลิตร
- นำสารละลายไทโรซีนจากข้อ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาหาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับตัวอย่าง
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีน กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร) ปริมาณโปรตีนที่คำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานไทโรซีน



ก6 การวิเคราะห์หาแอมโมเนีย (Parris and Foglia, 1983)

สารเคมี

- 0.1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก
- 0.05 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์
- เมทิลเรด

วิธีการ

- สุ่มตัวอย่างหนัก 10 กรัมลงในหลอด Kjeldahl
- เติมน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (DI) 200 มิลลิลิตร

3. เติมเมกนีเซียมออกไซด์ 10 กรัม
4. เติมสารป้องกันการเกิดฟอง
5. ทำการกลั่นตัวอย่างลงในพลาสติกที่บรรจุ 0.1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จนได้ของเหลวปริมาณ 100 มิลลิลิตร
6. ไตรเตรทด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้เมทิลเรดเป็นอินดิเคเตอร์

วิธีคำนวณ



ปริมาณ 0.1 M HCl ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยากับ NH_3 ที่กลั่นได้ เท่ากับ 20 มิลลิลิตร = 0.002 mol

หาปริมาณ HCl ส่วนเกินที่ใช้ไปจากปริมาณของ 0.05 M NaOH ที่ใช้ไตรเตรท

จำนวนโมลของ HCl ที่ใช้ในการจับกับ NH_3 =

$$\frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.05M)} \times \text{ปริมาตรของ 0.05 M NaOH ที่ใช้ไตรเตรท}}{1000}$$

ปริมาณแอมโมเนีย = ((0.002 mol - จำนวนโมล HCl ที่ใช้ไป) x 17)/น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

ก7 การตรวจสอบรูปแบบโปรตีน โดยใช้วิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมินิเจล

สารเคมี

1. Acrylamide/bis-acrylamide : ละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน หลังจากรเตรียม

2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดค่า 8.8
3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดค่า 6.8
4. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
5. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 5 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

6. Sample buffer (non-reducing buffer) :

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	0.1514	กรัม
กลีเซอรอล	2.5	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.25	กรัม
EDTA	0.0186	กรัม
โบรโมฟินอลบลู	0.25	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดต่างให้ได้ 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

7. Sample buffer (reducing buffer)

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	0.1514	กรัม
กลีเซอรอล	2.5	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.25	กรัม
EDTA	0.0186	กรัม
โบรโมฟินอลบลู	0.25	กรัม
เบต้า-เมอแคปโตเอทานอล	0.25	กรัม

นำมาทำละลายในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดต่างให้ได้ 6.8 แล้วปรับปริมาตร เป็น 25 มิลลิลิตร

8. Electrode buffer :

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	3.0	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

9. Catalyst ประกอบด้วย

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เตรียมก่อนใช้)

TEMED (N,N,N,N-tetramethyl ethylenediamine)

10. โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล High Molecular Weight (Sigma)

ประกอบด้วย myosin, β -galactosidase, phosphorylase b, fructose-6-phosphate kinase, albumin, glutamic dehydrogenase, ovalbumin, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase มีน้ำหนักโมเลกุล 250,000 116,000 97,000 84,000 66,000 55,000 45,000 และ 36,000 คาลตัน ตามลำดับ

11. สีย้อมโปรตีน Coomassie Brilliant Blue R-250

12. Staining solution: Coomassie Brilliant Blue R-250 ละลาย 0.04 กรัม ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด แล้วเติม Glacial acetic acid 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร

13. Destaining solution 1: ผสมเมธานอล 200 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 30 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร

14. Destaining solution 2: ผสมเมธานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 75 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่าง 3 กรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 27 มิลลิลิตร โฮโมจีไนส์ 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5,500g นาน 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาผสมกับ sample buffer (อัตราส่วน 1:1) ให้มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ต้มสารละลายในน้ำเดือด นาน 3 นาที ทำให้เย็นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม running gel (10% gel) (สำหรับเจล 2 แผ่น)

30% Acrylamide/0.8% bis-acrylamide	3.333 มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8	2.500 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4.012 มิลลิลิตร
10% SDS	100 ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	50 ไมโครลิตร
เขย่าให้เข้ากัน	
TEMED	5 ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูใส่ในแผ่นเจล แผ่นละ 3.5 มิลลิลิตร

3. การเตรียม stacking gel (สำหรับเจล 2 แผ่น)

30% Acrylamide/0.8% bis-acrylamide	0.665 มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8	1.250 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.000 มิลลิลิตร
10% SDS	50 ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	25 ไมโครลิตร
เขย่าให้เข้ากัน	
TEMED	3 ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูใส่ในแผ่นเจล แผ่นละ 3.5 มิลลิลิตร

4. การแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ประกอบชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber ด้านใน จากนั้นใส่ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 จำนวน 6 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของโปรตีน 18 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเติม electrode buffer ใน chamber ด้านนอก ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้ากับ power supply เปิดกระแสไฟฟ้า 30 mA (สำหรับเจล 2 แผ่น) รอจนสีของโบรมิโนลบลูเคลื่อนที่จนเกือบสุดปลายกระຈก จึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า

5. การย้อมสีโปรตีนในเจล

นำเจลมาย้อมสีโดยแช่ใน staining solution นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ใน Destaining solution 1 นาน 15 นาที แล้วนำมาแช่ทิ้งไว้ข้ามคืนใน Destaining solution 2

ภาคผนวก ข การตรวจสอบการละลายของโปรตีน (ดัดแปลงจาก Chawla *et al.*, 1996)

สารเคมี

1. สารละลาย S1: สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.6 โมลาร์
2. สารละลาย S2: สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 1)
3. สารละลาย S3: S2 ที่มีสารละลายยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์
4. สารละลาย S4: S2 ที่มีสารละลายยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ และสารละลายเบต้า-เมอแคปโทเอธานอล เข้มข้นร้อยละ 2
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์
6. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 50 (แช่เย็นก่อนใช้)
7. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 (แช่เย็นก่อนใช้)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในสารละลาย S1 S2 S3 และ S4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โฮโมจิไนซ์ที่ 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที
2. นำมาเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 4 ชม.
3. นำแต่ละชุดการทดลองทำการทดลองดังนี้
 - นำชุดการทดลองสารละลาย S2 และ S3 มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg นาน 30 นาที
 - นำชุดการทดลองสารละลาย S1 มาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชม. แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg นาน 30 นาที

- นำชุดการทดลองสารละลาย S4 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือด 2 นาที แล้วนำมาเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 4 ชม. และนำมาหมวนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg นาน 30 นาที
- 4. นำส่วนใสที่ได้ จำนวน 10 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง
- 5. นำมาหมวนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg นาน 30 นาที แยกเอาส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 2 มิลลิลิตร นำมาหมวนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg นาน 30 นาที แยกเอาส่วนใสทิ้ง
- 6. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนที่ได้และเติมลงในตัวอย่าง 1 กรัม ตั้งทิ้งไว้จนกว่าตะกอนและตัวอย่างจะละลายหมด
- 7. นำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรท เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) คำนวณปริมาณโปรตีนโดยหาร้อยละการละลายของโปรตีนเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ลงในตัวอย่างโดยตรงซึ่งเป็นชุดการทดลองที่มีร้อยละของการละลายของโปรตีนเท่ากับ 100

ข1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (Copeland, 1994)

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายไบยูเรท: ซังคอปเปอร์ซัลเฟต 1.5 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมทาทเรท 6.0 กรัม เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 300 มิลลิลิตร ในขณะที่กวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

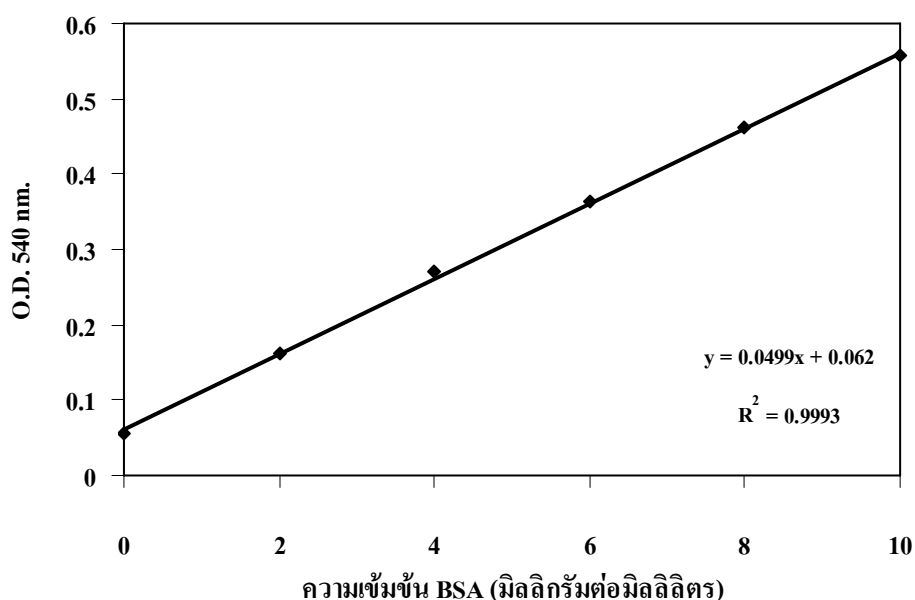
วิธีการ

1. ดูดสารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. คูณสารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 200 300 400 และ 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 ไมโครกรัม
2. เติมน้ำกลั่นไปยูเรท จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA ซึ่งปริมาณโปรตีนคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน BSA



ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาค (ดัดแปลงจาก *Dublán-Garcia et al., 2005*)

อุปกรณ์

1. เครื่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800LV ประเทศญี่ปุ่น
2. เครื่องทำแห้งเหนือจุดวิกฤต (critical point dry) ยี่ห้อ Polaron รุ่น CPD 7501 ประเทศอังกฤษ
3. เครื่องเคลือบทอง (gold sputtering) ยี่ห้อ SPI Supplies รุ่น SPI-Module

สารเคมี

1. 1% glutaraldehyde
2. 0.1 M phosphate buffer, pH 7
3. 25, 50, 75, 95% และ absolute ethanol

ค1 วิธีการวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาค

1. Preparation

ทำการตัดชิ้นปลาหมึกทั้งสองชนิดในส่วนตรงกลางลำตัวทั้งด้านหน้า และด้านหลังให้มีขนาด 0.5x0.5x2 มิลลิเมตร โดยจะทำการวิเคราะห์เฉพาะ โครงสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อภายในของปลาหมึกทั้งสองชนิด
2. Fixation

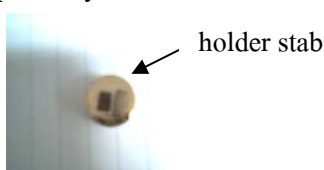
แช่ชิ้นปลาหมึกจากข้อ 1 แช่ในสารละลาย 1% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างชิ้นปลาหมึกด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 7
3. Dehydration

นำชิ้นปลาหมึกมาแช่ในสารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 70, 90% และ absolute ethanol 2 ครั้ง ตามลำดับ โดยแช่เป็นเวลา 30 นาที ในแต่ละความเข้มข้น
4. Critical point dry

ทำ Critical point dry โดยใช้ liquid carbon dioxide ในการแทนที่เอทานอลในตัวอย่าง สภาวะที่ใช้ คือ

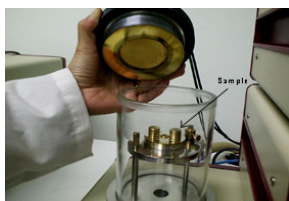
 - pressure : 1000 psi
 - temperature : cooling 4-5°C
 - : heating 39-40°C
5. Mounting

นำชิ้นปลาหมึกที่ทำ Critical point dry แล้วติดกับ holder stab



6. Coating

ทำการเคลือบตัวอย่างด้วยทอง โดยใช้เครื่อง Sputter coater นำตัวอย่างวางไว้บนแท่นวางตัวอย่างดังรูป



โดยทำให้ภายใน Chamber เป็นสุญญากาศ (vacuum ต่ำกว่า 10^{-1} torr/mmbar) จากนั้นเปิด gas Argon ที่วาล์วหัวถัง ปรับ pressure ที่ประมาณ 5 psi เพื่อให้อาร์กอนกระจายอยู่ใน chamber และปรับกระแสให้อยู่ที่ 10-20 mA ใช้เวลาในการเคลือบทองเป็นเวลา 120 วินาที

7. การตรวจดูและสร้างภาพโดย SEM

ทำการตรวจสอบตัวอย่างและถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง SEM ที่ accelerating voltage เท่ากับ 15 kV และ working distance เท่ากับ 20 mm และทำการบันทึกภาพที่ magnification x 10,000

ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ทางกายภาพ

ง1 การตรวจหาปริมาณน้ำอิสระ (free drip) และปริมาณน้ำที่ไหลออกจากกล้ามเนื้อ (expressible drip) (Hasegawa, 1987)

อุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ
2. เครื่องเจาะจุกคอรัทขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม.
3. กระดาษกรอง (Whatman No.1)
4. นาฬิกาจับเวลา
5. แทนน้ำหนักขนาด 5 กก.

วิธีการ

1. เจาะตัวอย่างปลาหมึกที่ผ่านการแช่เยือกแข็งด้วยเครื่องเจาะจุกคอรัทที่มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม.

2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (3 ซ้ำ) (x กรัม) แล้วนำไปวางในงานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรองวางอยู่ 2 แผ่น ปิดฝาจานเพาะเชื้อและนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม.
3. นำตัวอย่างออกมาชั่ง (y กรัม)
4. เพิ่มกระดาษกรอง 3 แผ่นวางด้านล่าง และ 2 แผ่นวางด้านบน
5. วางแทนน้ำหนักขนาด 5 กก. บนตัวอย่างเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำตัวอย่างออกมาชั่งน้ำหนัก (z กรัม)
6. คำนวณผลที่ได้จากสูตร

สูตร

$$\text{Free drip (\%)} = \frac{x-y}{x} \times 100$$

$$\text{Expressible drip (\%)} = \frac{x-z}{x} \times 100$$

ง2 การตรวจสอบการสูญเสียน้ำหนัก (Jatuphong *et al.*, 2000)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. ละลายตัวอย่างที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง
2. ต้มน้ำให้อยู่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนนำไปให้ความร้อนและนำตัวอย่างบรรจุใส่ในถุงพลาสติกที่ทนร้อน
4. ต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที
5. ตัดก้นถุงเพื่อให้น้ำไหลออกมาประมาณ 10 นาที
6. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังจากให้ความร้อน

การคำนวณ

$$\% \text{ cooking loss} = \frac{\text{g raw weight} - \text{g cooked weight}}{\text{g raw weight}} \cdot 100\%$$

ง3 การวัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดค่าสี

อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ Hunter lab รุ่น Color Flex

วิธีการ

1. วางตัวอย่างลงบนแท่นที่มีขนาด 1 นิ้ว
2. ใช้ฝาครอบปิดตัวอย่าง เพื่อมิให้แสงรบกวนจากภายนอก
3. เริ่มวัดค่าสีโดยใช้ระบบสีของ CIE Color System ค่าที่วัดได้จะเป็นค่า $L^* a^* b^*$

ง4 การวัดค่าความเป็นกรดต่าง (Dublán-Garcia *et al.*, 2005)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร
2. นำมาโฮโมจิไนซ์ที่ 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 x g นาน 15 นาที
3. นำส่วนที่ใสที่แยกได้ไปวัดค่าความเป็นกรดต่าง โดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)

ง5 การตรวจสอบคุณลักษณะเนื้อสัมผัส (ดัดแปลงจาก Dublán-Garcia *et al.*, 2005)

อุปกรณ์

1. เครื่อง Texture Analyzer ยี่ห้อ STABLE MICRO SYSTEM รุ่น TA-XT2i
2. หัววัด Warner-Blatzler Blade

วิธีการ

นำตัวอย่างเนื้อตรงกลางลำตัวหมีกขนาด 2x3 ซม. โดยตัดตามแนวตั้งฉากกับเส้นใยกล้ามเนื้อมาวัดค่าแรงเคี้ยว โดยใช้ Warner-Blatzler Blade ความเร็ว 2 มิลลิเมตรต่อวินาที ทำการตัดตัวอย่างจนขาดออกจากกัน วัดค่าแรงสูงสุดที่ใช้ รายงานผลเป็นหน่วยนิวตัน (N)

ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

จ1 การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี Total viable count แบบ pour plate (speck, 1976)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. plate count agar (PCA)
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีปราศจากเชื้อ
2. นำตัวอย่างอาหารและสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เทในถุงพลาสติกเพื่อตีปนด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า โดยใช้ความเร็วระดับต่ำ เป็นระยะเวลา 2 นาที ตัวอย่างอาหารจะมีระดับความเจือจาง 1:10
3. เจือจางอาหารด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ให้มีระดับความเจือจางที่ต้องการ (1:100, 1:1000, 1:10000)
4. ปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจาง 3 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
5. เททับด้วยอาหาร PCA ประมาณ 15 มิลลิลิตร
6. หมุนจานเพาะเชื้อเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวประมาณ 15 นาที
7. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง
8. ตรวจสอบโคโลนีจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 30-300 โคโลนี และรายงานผล เป็นจำนวน Colony Forming Unit (CFU)/ กรัมตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{Total viable count (CFU/ กรัมตัวอย่าง)} = \text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี} \times \text{ระดับความเจือจาง}$$

จ2 การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ที่ขอบอุณหภูมิต่ำ แบบ pour plate (speck, 1976)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. plate count agar (PCA)
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในงานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีปราศจากเชื้อ
2. นำตัวอย่างอาหารและสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เทในถุงพลาสติกเพื่อตีปนด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า โดยใช้ความเร็วระดับต่ำ เป็นระยะเวลา 2 นาที ตัวอย่างอาหารจะมีระดับความเจือจาง 1:10
3. เจือจางอาหารด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ให้มีระดับความเจือจางที่ต้องการ (1:100, 1:1000, 1:10000)
4. ปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจาง 3 ระดับ ระดับละ 2 ซ้ำ ลงในงานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
5. เททับด้วยอาหาร PCA ประมาณ 15 มิลลิลิตร
6. หมุนงานเพาะเชื้อเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวประมาณ 15 นาที
7. บ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในลักษณะคว่ำงานเพาะเชื้อ เป็นระยะเวลา 7 วัน
8. ตรวจสอบโคโลนีจากงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 30-300 โคโลนี และรายงานผล เป็นจำนวน Colony Forming Unit (CFU)/ กรัมตัวอย่าง

การคำนวณ

Aerobic plate count (CFU/ กรัมตัวอย่าง) = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี x ระดับความเจือจาง

ภาคผนวก ฉ การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ฉ1 การฝึกฝนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส

วิธีการ

ใช้ผู้ทดสอบในการฝึกฝน 12 คน ประเมินคุณภาพมีกสคทั้งตัว (ตัวอย่างละ 8-10 ตัว) จากลักษณะของส่วนต่างๆ

- ผิวหนัง (skin) โดยตรวจสอบความสมบูรณ์ของผิวหนัง ลักษณะโดยรวม (appearance), สี (color), กลิ่น (odour) และเมือก (mucus)
- เนื้อ (flesh) โดยทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัส (texture)
- ตา (eyes) โดยตรวจสอบลักษณะปรากฏ
- บริเวณปาก (mouth region) โดยตรวจสอบ สี (color), กลิ่น (odour), เมือก (mucus)

โดยใช้วิธีการทดสอบ ดังนี้

ฉ2 Quality Index Method (QIM) (Vaz-Piras and Seixas, 2006)

- QIM ของหมึกกระดอง

พารามิเตอร์ของคุณภาพความสด	รายละเอียดคุณลักษณะ	QIM score
ผิวหนัง (ด้านหลัง)		
1. ลักษณะปรากฏและสี	- ลำตัวใสมาก/สะท้อนสีรุ้งตลอดทั้งลำตัว (0)	(0)
	- ลำตัวใส/เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเทาอ่อนหรือสีเทา (1)	(1)
	- ลำตัวค่อนข้างทึบแสง/มีสีม่วงแดงโดยเฉพาะที่ครีบก้นและข้างลำตัว (2)	(2)
	- ลำตัวทึบแสง/มีสีม่วงข้างลำตัว, กลางลำตัวมีสีน้ำตาล (3)	(3)
2. กลิ่น	- กลิ่นสาหร่ายทะเล, กลิ่นสด (กลิ่นทะเล) (0)	(0)
	- กลิ่นสาหร่ายเล็กน้อย, ไม่มีกลิ่น (1)	(1)
	- กลิ่นคาว, กลิ่นโลหะ (2)	(2)
ผิวหนัง (ด้านท้อง)		
ความยืดหยุ่น/สี	- ยืดหยุ่น, แน่นมาก/สีขาว (0)	(0)
	- นุ่ม, เมื่อดึงเกิดรอยย่น/สีชมพู (1)	(1)
เนื้อ		
เนื้อสัมผัส	- แน่นมาก, ดึง, ยึดติดกันเหนียวแน่น (0)	(0)
	- แน่น, เหนียวแน่นน้อยลง (1)	(1)
	- อ่อนนุ่ม (2)	(2)
ตา		
กระจกตา	- โปร่งแสง (ยอมให้แสงผ่านได้บ้าง), เป็นน้ำ, แฉวาว (0)	(0)
	- เป็นสีน้ำตาลเล็กน้อย (1)	(1)
	- เป็นสีน้ำตาล (2)	(2)
รูม่านตา (ช่องตาดำ)	- สีดำแวววาว (0)	(0)
	- สีดำมัวหมอง (1)	(1)
	- สีแดงเข้ม, สีแดงเหมือนเลือด (2)	(2)
บริเวณปาก		
กลิ่น	- กลิ่นสาหร่าย, กลิ่นสด (0)	(0)
	- ไม่มีกลิ่น (1)	(1)
	- กลิ่นคาวเล็กน้อย (2)	(2)
	- กลิ่นคาวรุนแรง/เข้ม, มีกลิ่นซัลเฟอร์ (เหมือนกะหล่ำปลีเน่า) (3)	(3)
กระดูกภายใน		
การติดกันของกระดูก/หัว	- ยึดแน่นติดกับส่วนของหัว (0)	(0)
	- ยึดติดกับส่วนหัวอย่างหลวมๆ (1)	(1)
Rang of QIM score		0-16

- QIM ของหมึกกล้วย

พารามิเตอร์ของคุณภาพความสด	รายละเอียดคุณลักษณะ	QIM score
ผิวหนัง (ด้านหลัง)		
1. ลักษณะปรากฏและสี	- สีสดใสมาก/บ่งบอกความแตกต่างเม็ดสีอย่างชัดเจน ได้แก่ ขนาดและสี (น้ำตาล, ม่วง, แดง, แดงเข้ม), สีเหลืองเป็นรู้ง	(0)
	- สีสดใส/เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงสี	(1)
	- สีค่อนข้างขุ่น, ไม่มีความแวววาว, มีสีม่วงตรงกลางลำตัว, เกิดพื้นที่สีส้ม, สีชมพู	(2)
2. กลิ่น	- กลิ่นสาหร่ายทะเล, กลิ่นสด (กลิ่นทะเล)	(0)
	- กลิ่นสาหร่ายทะเลอ่อนๆ	(1)
	- กลิ่นน้ำทะเล, กลิ่นคาวเล็กน้อย	(2)
	- กลิ่นคาว, กลิ่นโลหะ	(3)
เนื้อ		
เนื้อสัมผัส	- แน่น, ตึงแน่น, ยึดติดกันเหนียวแน่น	(0)
	- นุ่ม, เหนียวแน่นน้อยลง	(1)
	- อ่อนนุ่ม	(2)
ตา		
รูปร่าง/ลักษณะปรากฏ	- โค้งนูน	(0)
	- แบน	(1)
	- เว้าลง	(2)
เนื้อเยื่อตา	- โปร่งแสง, เป็นน้ำ	(0)
	- เป็นสีน้ำตาลเล็กน้อย	(1)
	- สีน้ำตาล	(2)
บริเวณปาก		
กลิ่น	- กลิ่นสาหร่าย, กลิ่นสด	(0)
	- ไม่มีกลิ่น	(1)
	- กลิ่นคาวเล็กน้อย, กลิ่นกรด	(2)
	- กลิ่นคาวรุนแรง/เข้ม, มีกลิ่นซัลเฟอร์ (เหมือนกะหล่ำปลีเน่า)	(3)
Rang of QIM score		0-14

จ3 ใบรายงานการทดสอบด้วยวิธี Quality Index Method (QIM)

ตัวอย่างหมึกกล้วย

ผู้ทดสอบ วันที่

คุณลักษณะ	ช่วงคะแนน	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....
ผิวหนัง (ด้านหลัง)					
1. ลักษณะปรากฏ/สี	0-2				
2. กลิ่น	0-3				
เนื้อ					
เนื้อสัมผัส	0-2				
ตา					
1. รูปร่าง/ลักษณะปรากฏ	0-2				
2. เนื้อเยื่อตา	0-2				
บริเวณปาก					
1. กลิ่น	0-3				
รวม	0-14				

ตัวอย่างหมึกกระดอง

ผู้ทดสอบ วันที่

คุณลักษณะ	ช่วงคะแนน	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....
ผิวหนัง (ด้านหลัง)					
1. ลักษณะปรากฏและสี	0-3				
2. กลิ่น	0-2				
ผิวหนัง (ด้านท้อง)					
ความยืดหยุ่น/สี	0-1				
เนื้อ					
เนื้อสัมผัส	0-2				
ตา					
1. กระจกตา	0-2				
2. รูม่านตา (ช่องตาดำ)	0-2				
บริเวณปาก					
กลิ่น	0-3				
กระดูกภายใน					
การติดกันของกระดูก/หัว	0-1				
รวม	0-16				

ฉ4 การทดสอบคุณภาพโดยรวม (Lawless and Heymann, 1999)

โดยพิจารณาสี ลักษณะปรากฏ กลิ่นและเนื้อสัมผัส ทั้งส่วนหัวและส่วนลำตัวของ
หมึกทั้งสองสายพันธุ์

ใบรายงานการทดสอบ

ตัวอย่าง ผู้ทดสอบ..... วันที่

คำแนะนำ: กรุณาทดสอบตัวอย่างโดยพิจารณาคุณภาพโดยรวมเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม แล้ว
วงกลมรอบหมายเลขที่ตรงตามคุณลักษณะที่ท่านเลือก

รหัส

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reject		Unacceptable			Acceptable			Match	

รหัส

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reject		Unacceptable			Acceptable			Match	

รหัส

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reject		Unacceptable			Acceptable			Match	

รหัส

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reject		Unacceptable			Acceptable			Match	

ฉ5 Multisample Difference Test (Meilgaard *et al.*, 1999)

ใบรายงานการทดสอบ

ตัวอย่าง ผู้ทดสอบ..... วันที่

คำแนะนำ: กรุณาทดสอบตัวอย่างโดยพิจารณาความแตกต่างของลักษณะเนื้อสัมผัสเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม แล้วให้คะแนนที่ตรงตามคุณลักษณะที่ท่านเลือก

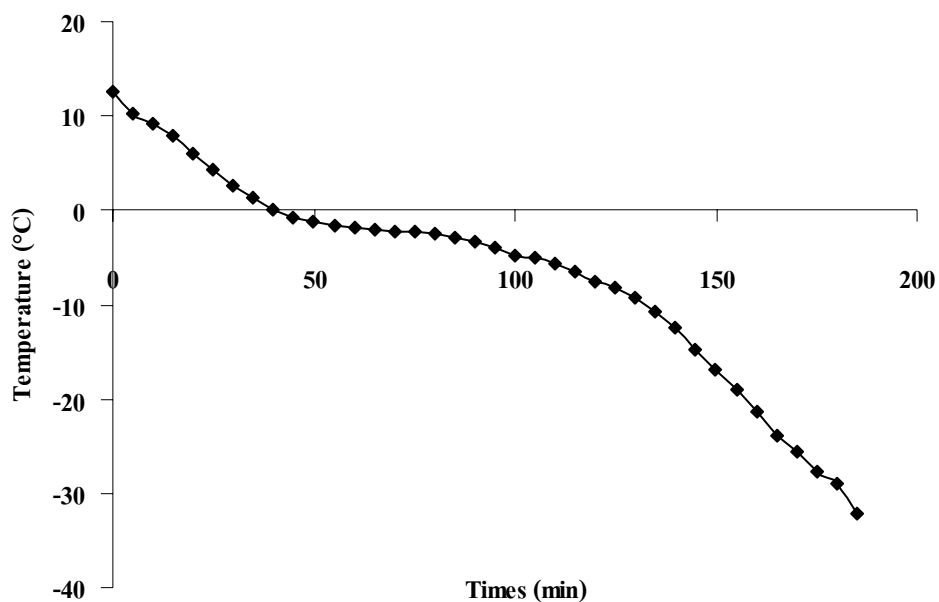
- | | |
|---|-----------|
| 0 | |
| 1 | นุ่มมาก |
| 2 | อ่อนนุ่ม |
| 3 | |
| 4 | เนื้อแน่น |
| 5 | |
| 6 | เหนียว |
| 7 | |
| 8 | เหนียวมาก |
| 9 | |

รหัสตัวอย่าง
 คะแนน

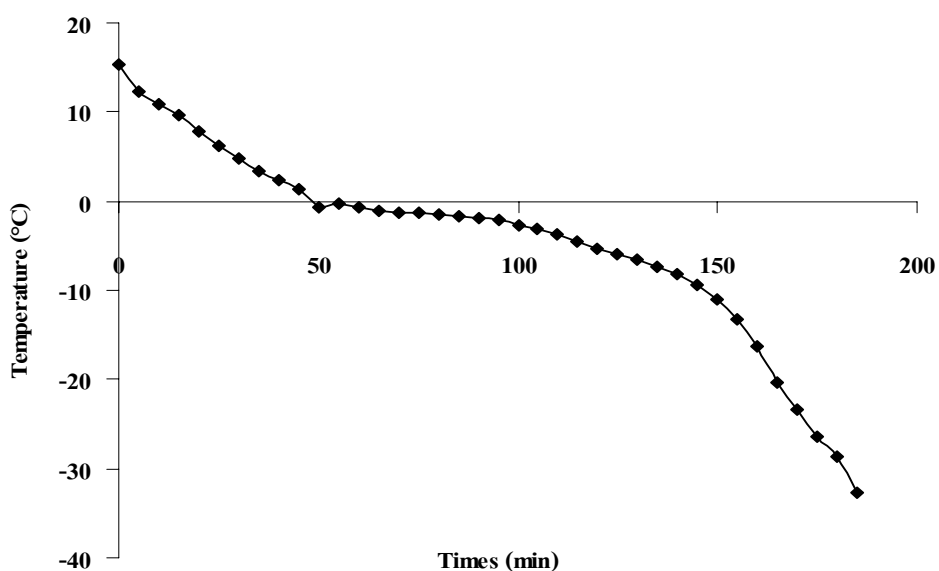
ข้อเสนอแนะ

ภาคผนวก ข อัตราการแช่เยือกแข็ง

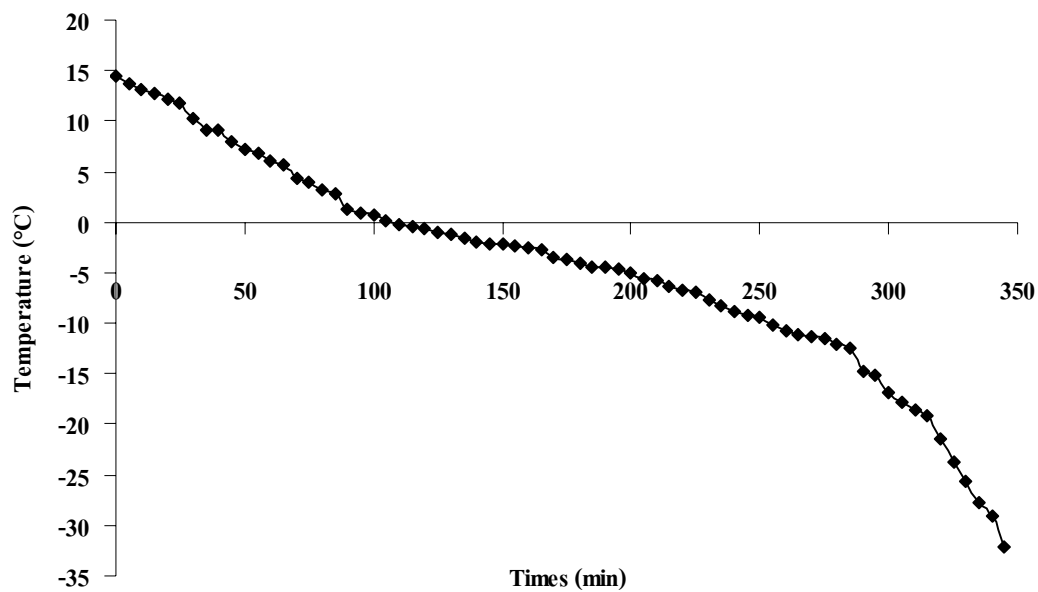
ข1 อัตราการแช่เยือกแข็ง ตามวิธี Boonsumrej และคณะ 2007



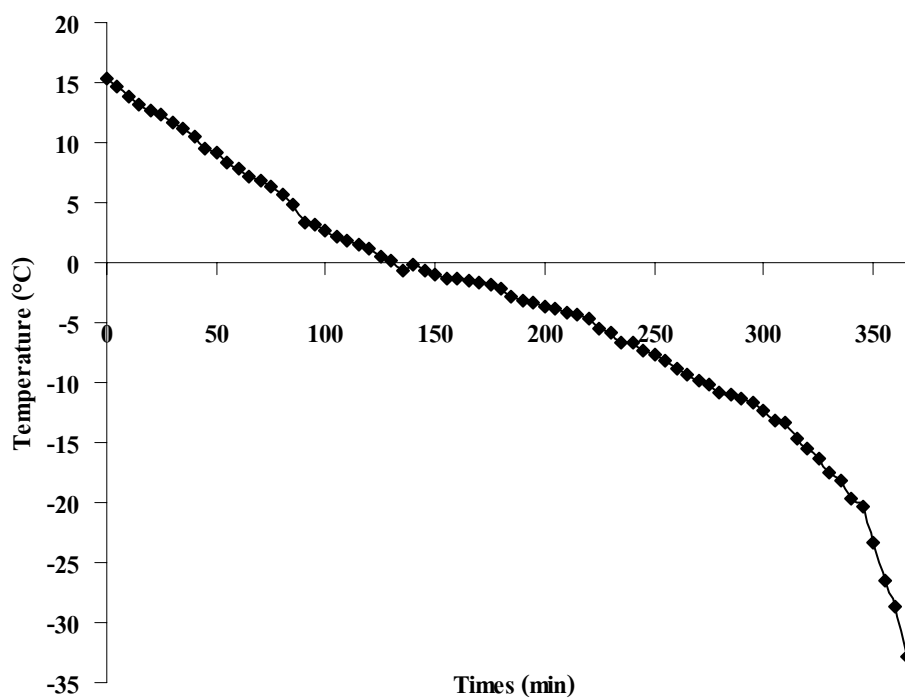
Appendix Figure 1 Temperature changes of squid frozen using contact plate freezing during storage at -18°C .



Appendix Figure 2 Temperature changes of cuttlefish frozen using contact plate freezing during storage at -18°C .



Appendix Figure 3 Temperature changes of squid frozen using air-blast freezing during storage at -18°C .



Appendix Figure 4 Temperature changes of cuttlefish frozen using air-blast freezing during storage at -18°C .

วิธีการคำนวณ (Pan and Yeh, 1993)

อัตราการแช่เยือกแข็ง (ชม./ชม.) = $\frac{\text{ระยะทางน้อยสุดจากพื้นผิวถึงจุดกึ่งกลางของหมึกกล้วย}}{\text{เวลา (ชม.) ที่ถึงอุณหภูมิ } -18^{\circ}\text{C}}$

Table 1 Freezing rate of squid and cuttlefish frozen using air-blast and contact plate freezing methods.

Sample	Method	Freezing rate (cm/h)
squid	contact plate freezing	1.36
	airblast freezing	0.68
cuttlefish	contact plate freezing	1.27
	airblast freezing	0.63

ภาคผนวก ข การคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Rees, 1995)

การคำนวณ

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}, \quad \bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$Sr^2 = \frac{[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}] - b^2 [\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}]}{n-2}$$

แทนค่าตัวแปรทั้งหมดในสมการ

$$(a + bx_0) \pm tSr \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

x_0 หมายถึง ค่า x ใดๆ

n หมายถึง จำนวนวันที่เก็บรักษา

ค่า t จากตาราง Critical Values of t (One-Tailed Test)

$$\alpha = 0.01, \text{ ค่า } t_{0.005} = 3.499$$

$$\alpha = 0.05, \text{ ค่า } t_{0.025} = 2.365$$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวอติศรา ต้นตสุทติกุล		
รหัสประจำตัว	5011020040		
วุฒิการศึกษา			
	วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีอาหาร)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

โครงการทักษะนักอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Tantasuttikul, A., Kijroongrajana, K. and Benjakul, S. 2009. Study on quality indices of squid (*Photololigo duvaucelii*) and cuttlefish (*Sepia aculeata*) during iced storage. The 10th Annual Conference of Thai Society of Agricultural Engineering. Suranaree University of Technilogy, Nakhon Ratchasima, Thailand.