บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. คุณภาพกุ้งกุลาดำ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละโดยน้ำหนักเปียก) ของกุ้งกุลาดำ ดังตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ และให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของพงศ์ธร พิทักษ์โกศลพงศ์ (2535) ซึ่งพบว่า ในส่วนที่บริโภคได้ของกุ้งกุลาดำ มีปริมาณ โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า อยู่ในช่วงร้อยละ 20.7 - 21.56, 0.14 - 0.15, 76.07 - 76.25 และ 1.13 - 1.54 อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งอาจแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา (กุ้งจากการเพาะเลี้ยงและกุ้งจากแหล่งธรรมชาติ) แหล่งที่จับ พันธุ์ของกุ้ง และฤดูกาล (นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531)

การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีของเนื้อกุ้งกุลาดำ โดยการวิเคราะห์ปริมาณด่างที่ระเหยได้ (TVB-N) และไตรเมทธิลอะมีน (TMA-N) พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 19.95 และ 2.45 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่ง Montgomery และคณะ (1970, อ้างโดย สุนิสา ศรีพงษ์พันธุ์กุล, 2535) รายงานว่า กุ้งที่มีปริมาณ TVB-N มากกว่า 30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง จัดว่าเป็นกุ้งที่เสื่อมเสีย Stansby (1963, อ้างโดย Lannelongue *et al.*, 1982) ได้จัดแบ่งคุณภาพปลาจากปริมาณ TVB-N ดังนี้ คือ ปลาสดมีปริมาณ TVB-N น้อยกว่า 12 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ปลาที่ยังมีคุณภาพดีจนถึงปลาที่เสื่อมเสียเล็กน้อยมีปริมาณอยู่ในช่วง 12 ถึง 20 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ส่วนปลาที่เสื่อมเสียจนไม่สามารถบริโภคได้มีปริมาณมากกว่า 25 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง นอกจากนี้ปริมาณ TMA-N สามารถใช้ในการบ่งชี้คุณภาพของสัตว์น้ำได้เช่นกัน ซึ่ง Hebard และคณะ (1982 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2544) ได้จัดแบ่งคุณภาพสัตว์น้ำโดยใช้ปริมาณไตรเมทธิลอะมีนไว้ดังนี้ สัตว์น้ำที่มีคุณภาพดีมากมีปริมาณ TMA-N อยู่ในช่วง 0 ถึง 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง สัตว์น้ำที่สามารถนำออกจำหน่ายในตลาดได้มีปริมาณ TMA-N อยู่ในช่วง 1 ถึง 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และสัตว์น้ำที่ไม่สามารถนำมาบริโภคได้ มีปริมาณ TMA-N มากกว่า 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง เช่นเดียวกับ Cobb III และคณะ (1973) รายงานว่ากุ้งมีคุณภาพไม่เป็นที่ยอมรับหากมีปริมาณ TMA-N มีค่า 5 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ดังนั้นกุ้งกุลาดำที่ใช้ในการทดลองยังคงมีคุณภาพดีถึงเสื่อมเสียเล็กน้อย

การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพของกุ้งกุลาดำ โดยการตรวจสอบค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อกุ้งกุลาดำ พบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.87 ซึ่ง Jay (1978 อ้างโดย สุนิสา ศรีพงษ์พันธุ์กุล, 2535) พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีในการบ่งชี้คุณภาพและความสดของกุ้งได้

โดยทั่วไปในระยะที่เนื้อสัตว์มีความสดสูงสุดมักมีค่าความเป็นกรดด่างเป็นด่างคือประมาณ 6.8 -7.0 จากการทดลองของ Flores และ Crawford (1973) พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างของกุ้งสด *Padalus braseliensis* มีค่าเท่ากับ 6.75 นอกจากนี้ Fatima และ Qadri (1979) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของกุ้งกุลาดำมีค่าเท่ากับ 6.84 และเมื่อทำการขนส่งกุ้งกุลาดำในเวลา 26 ชั่วโมงพบว่าค่าความเป็นกรดด่างของกุ้งกุลาดำที่แช่ในน้ำแข็งเพิ่มขึ้นเป็น 7.38

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมี และคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของเนื้อกุ้งกุลาดำสด

Chemical composition and sensory characteristic of black tiger shrimp muscle.

Composition / qualities	content / score
Protein	18.06 ± 0.06% wet basis
Fat	0.31 ± 0.01% wet basis
Moisture	78.31 ± 0.37 % wet basis
Ash	0.81 ± 0.03% wet basis
TVB-N	19.95 ± 2.46 mg nitrogen / 100 g sample
TMA-N	2.45 ± 0.41 mg nitrogen / 100 g sample
pH	6.87 ± 0.01
Sensory scores of black tiger shrimp	
- color	4
- texture	3
- odor	4

All values are means ± standard deviations of 9 determinations (3 determinations on each of 3 lots of shrimp).

การทดสอบทางประสาทสัมผัสของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 5 คน ทำการทดสอบคุณภาพในด้านกลิ่น พบว่ามีคะแนนเฉลี่ย 4 คะแนน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำมีกลิ่นคล้ายสาหร่ายหรือหญ้า (grassy-seaweed odor) ในด้านลักษณะเนื้อสัมผัส พบว่ามีคะแนนเฉลี่ย 3 คะแนน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำมีลักษณะเนื้อสัมผัสนิ่มเล็กน้อย (slight soft texture) และในด้านสี พบว่ามีคะแนนเฉลี่ย 4 คะแนน ซึ่งแสดงว่ากุ้งกุลาดำมีสีสดใสสม่ำเสมอตามพันธุ์ของกุ้งกุลาดำ

(uniform color) ดังนั้นกุ้งกุลาดำที่ใช้เป็นวัตถุดิบยังคงมีคุณภาพดี ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของประเสริฐ สายสิทธิ์ (2527) ซึ่งพบว่ากุ้งกุลาดำสดต้องมีรูปร่างที่คงรูปปกติ สีสดใสตามพันธุ์ของกุ้งกุลาดำซึ่งอาจมีตั้งแต่ สีฟ้าจนถึงสีน้ำตาลดำ เปลือกแข็งเรียบเป็นมันติดแน่นกับเนื้อ มีกลิ่นสาหร่ายทะเลหรือกลิ่นทะเล นอกจากนี้ไม่ควรมีกลิ่นแปลกปลอม เช่น กลิ่นโคลนหรือกลิ่นหญ้าหมัก เหงือกสีขาวใส ตากลมนูนสีดำเห็นประกาย ปราศจากตำหนิ เช่น รอยถลอก เมื่อทำให้สุกมีรสชาติดี กลิ่นหอม รสหวาน และเนื้อสดควรมีลักษณะเงาสีใส เนื้อสัมผัสยืดหยุ่น เมื่อทำให้สุกขึ้นเนื้อเกาะกันแน่น ไม่ยุ่ยและ

2. ผลของความดันหรือความร้อนต่อคุณลักษณะโปรตีนกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ

การใช้ความดันหรือความร้อนมีผลต่อลักษณะโปรตีนกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ ดังนี้

2.1 ลักษณะปรากฏ

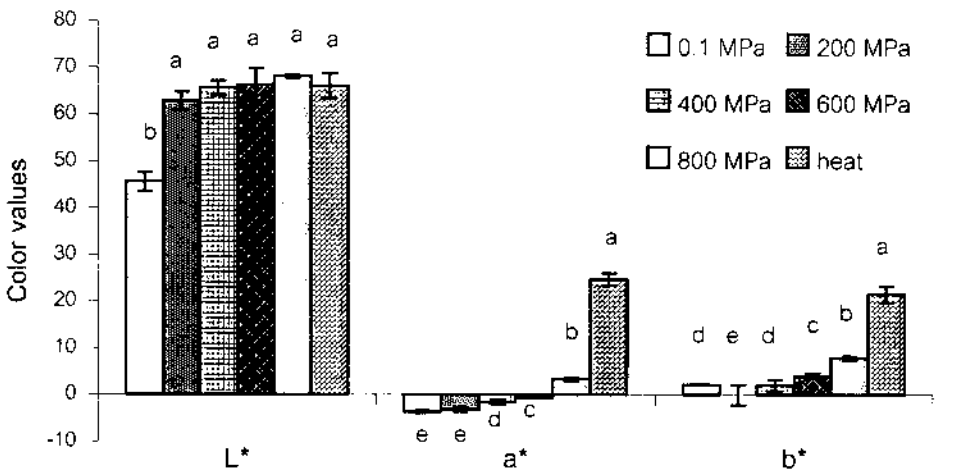
2.1.1 ความขุ่น

โดยทั่วไปเนื้อกุ้งกุลาดำสดมีลักษณะเงา สีใส มีเนื้อสัมผัสนิ่มเล็กน้อย แต่ภายหลังจากกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำได้รับความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล เนื้อกุ้งจะมีลักษณะขุ่นทึบแสง (opaque) เล็กน้อย เมื่อให้ความดันเพิ่มขึ้นกุ้งจะมีลักษณะขุ่นทึบแสงเพิ่มขึ้น โดยเนื้อกุ้งจะมีลักษณะขุ่นคล้ายคลึงกับสีของเนื้อกุ้งที่ผ่านการให้ความร้อน

2.1.2 สี

กุ้งกุลาดำสดจะมีสีเทาดำสดใสและสม่ำเสมอ เนื้อกุ้งมีลักษณะเงา สีใส มีเนื้อสัมผัสนิ่มเล็กน้อย เม็ดสีที่มีผลต่อสีของกุ้งส่วนใหญ่พบอยู่บริเวณผิวใต้เปลือก กลุ่มเม็ดสีที่มีบทบาทสำคัญคือกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ซึ่งได้แก่ แอสตาแซนธิน (astaxanthin) (Okada *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังพบแคโรทีโนโปรตีน (carotenoprotein) ทั้งสีน้ำเงินและสีแดงในเนื้อกุ้ง ดังนั้นสีที่ปรากฏในกุ้งกุลาดำจึงอาจเกิดจากผลรวมระหว่างสีของแอสตาแซนธินเอสเทอร์และสีของแคโรทีโนโปรตีน (Okada *et al.*, 1995) จากภาพที่ 7 พบว่าค่าความสว่าง (ค่า L*) ของกุ้งที่ผ่านการให้ความดันทุกชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ohshima และคณะ (1993) โดยพบว่าเมื่อกล้ามเนื้อปลาคอดได้รับความดันในระดับ 608 เมกกะปาสคาล นาน 15 นาที ค่าความสว่าง (ค่า L) เพิ่มขึ้น และจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อให้ความดันเพิ่มขึ้น และในปลาแมคเคอเรล ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยค่า L จะเพิ่มขึ้นเมื่อความดันเพิ่มขึ้น Ashie และ Simpson (1996) พบว่า ความดันทำให้เนื้อปลา bluefish มีค่าความสว่างเพิ่มขึ้นและมีลักษณะคล้ายเนื้อปลาที่ผ่านการต้ม เมื่อให้ความดันเพิ่มขึ้นค่าความสว่างก็จะเพิ่มขึ้น ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนมีค่า L* ไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 400 600 และ 800 เมกกะปาสคาล

($p \geq 0.05$) ค่าสีแดง-สีเขียว (ค่า a*) และค่าสีเหลือง-สีน้ำเงิน (ค่า b*) ของกุ้งกุลาดำที่ผ่านการให้ความดันมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน โดยสีของกุ้งจะเปลี่ยนจากสีเทาน้ำเงินเป็นสีแดงหรือสีส้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน เนื่องจากรงควัตถุที่สำคัญในกุ้งคือ แอสตาแซนธิน ซึ่งเป็นรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีสีแดงเมื่อจับรวมตัวกับโปรตีนเกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนจะมีสีน้ำเงิน การเสียสภาพของโครงสร้างเชิงซ้อนของแอสตาแซนธินกับโปรตีนอันเนื่องมาจากความร้อน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง spectroscopic และคุณสมบัติการมองเห็นสีของรงควัตถุ ดังนั้นจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง (Von Elbe and Schwartz, 1996) จะเห็นได้ว่าความดันทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเช่นเดียวกับผลของความร้อน โดยที่ความดันที่ระดับต่ำ (200 เมกกะปาสคาล) ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนบางส่วน ขณะที่ความดันตั้งแต่ 400 เมกกะปาสคาล ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนมากขึ้น จึงทำให้สีของกุ้งกุลาดำที่ผ่านการให้ความดันมีสีแดงเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน แต่อย่างไรก็ตาม ค่า a* และค่า b* ของตัวอย่างที่ให้ความดันมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เนื่องจากกุ้งที่ผ่านการให้ความร้อนเกิดการเสียสภาพอันเนื่องมาจากอุณหภูมิสูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดัน



ภาพที่ 7 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) และความร้อน (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที) ต่อค่าสี (L*, a* และ b*) ของเนื้อกุ้งกุลาดำ

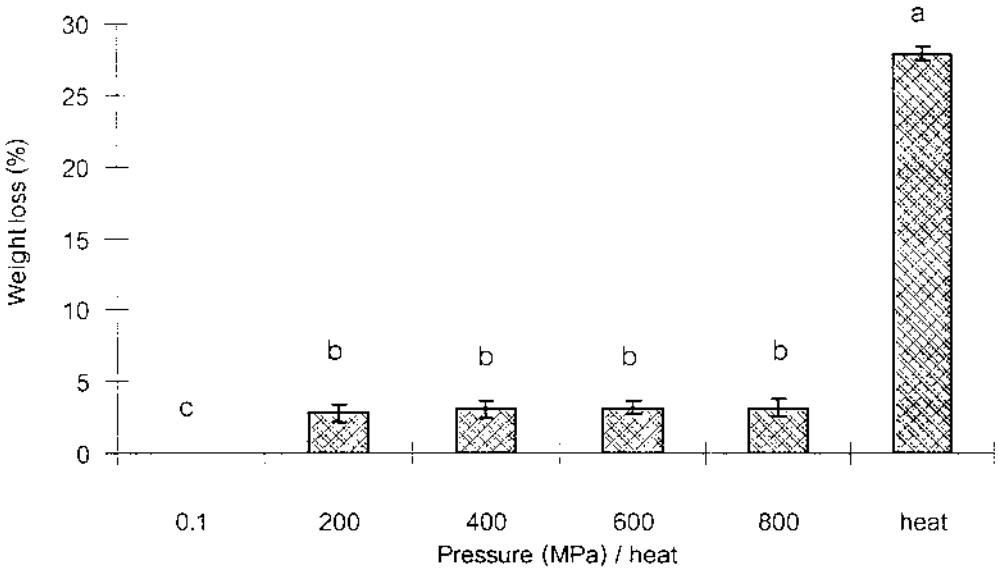
The effect of high pressure (200-800 MPa, 20 min) and heat treatment (100 °C, 2 min) on color (L*, a* and b*) of black tiger shrimp muscle.

The same letters under the same color values indicate non significant differences ($p \geq 0.05$).

Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

2.2 **ค่าการสูญเสียน้ำหนัก**

ค่าการสูญเสียน้ำหนักของกุ้งกุลาดำในทุกชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p \geq 0.05$) แสดงดังภาพที่ 8 ส่วนในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความร้อน พบว่ามีค่าการสูญเสียน้ำหนักมากกว่าชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดัน ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการจับกับน้ำ (water binding capacity) ของโปรตีนจะลดลงเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการลดลงของพันธะไฮโดรเจนและลดการจับกับน้ำของหมู่ที่มีประจุ (Damodaran, 1996) นอกจากนี้พันธะไฮโดรเจนจะมีความคงตัวต่อความดันสูง และอาจถูกสร้างขึ้นได้ภายใต้สภาวะความดันเมื่อมีการลดลงของปริมาตรเพียงเล็กน้อย (Messens *et al.*, 1997) จึงทำให้กุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดัน สามารถเก็บกักน้ำอยู่ในโครงสร้างของโปรตีนได้มากกว่ากุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความร้อน



ภาพที่ 8 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) และความร้อน (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที) ต่อค่าการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อกุ้งกุลาดำ

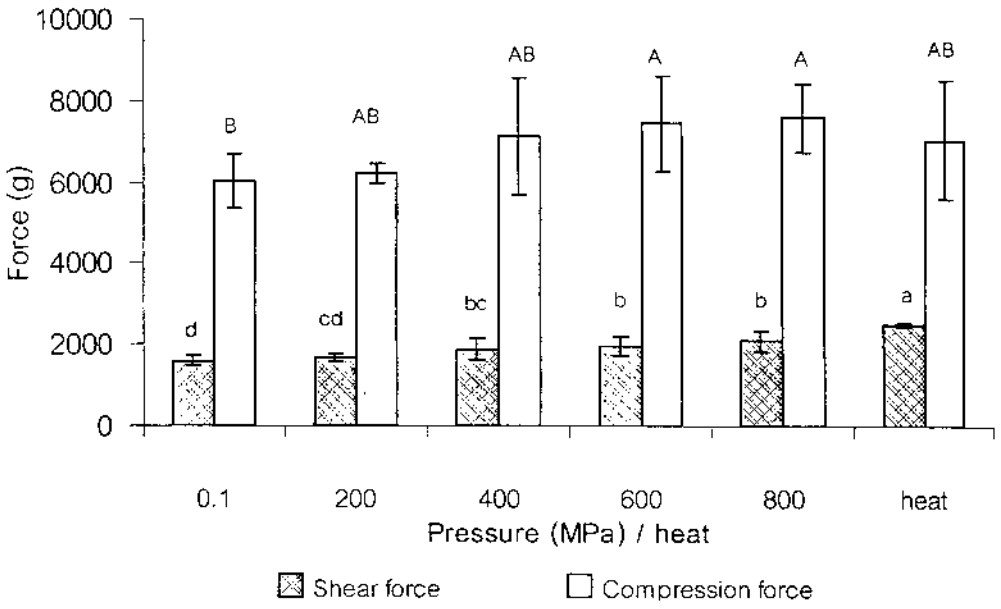
The effect of high pressure (200-800 MPa, 20 min) and heat treatment (100 °C, 2 min) on drip loss of black tiger shrimp muscle.

The same letters indicate non significant differences ($p \geq 0.05$).

Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

2.3 ค่าแรงเฉือนและค่าแรงกด

การให้ความดันแก่กุ้งกุลาดำทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของกุ้งมีลักษณะที่แข็งเพิ่มขึ้น โดยความดันทำให้ตัวอย่างมีค่าแรงกดและแรงเฉือนสูงกว่าตัวอย่างกุ้งสด (ชุดควบคุม) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับการให้ความดับ 600 และ 800 เมกกะปาสคาลจะมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงดังภาพที่ 9 นอกจากนี้ค่าแรงกดและแรงเฉือนมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yoshioka และ Yamamoto (1998) พบว่าการให้ความดันแก่ปลาคาฟ (carp) ที่ระดับสูงกว่า 500 เมกกะปาสคาล ค่าความแข็งจะเพิ่มสูงขึ้นและจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน ส่วนตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการให้ความร้อนมีค่าแรงกดที่ไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่ให้ความดัน ($p\geq0.05$) แต่มีค่าแรงเฉือนสูงกว่าตัวอย่างในชุดการทดลองที่ให้ความดันและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความร้อนทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแรงกระทำระหว่างโปรตีน (Deng, 1981) นอกจากนี้อาจจะเนื่องจากคุณลักษณะเนื้อสัมผัสสัมพันธ์กับปริมาณความชื้นที่มีในตัวอย่าง (Angsupanich and Ledward, 1998) การให้ความร้อนทำให้ความสามารถในการจับกับน้ำ (water binding capacity) ของโปรตีนจะลดลง เนื่องจากอุณหภูมิสูงทำให้เกิดการลดลงของพันธะไฮโดรเจนและลดการจับกับน้ำของหมู่ที่มีประจุ (Damodaran, 1996) เกิดการสูญเสียน้ำออกจากโครงสร้างของโปรตีนมาก (ดังภาพที่ 8) และมีปริมาณน้ำที่หลงเหลือในตัวอย่างในปริมาณน้อยจึงทำให้ตัวอย่างที่ให้ความร้อนมีลักษณะที่แห้งและแข็งกว่าตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดัน นอกจากนี้การให้ความดันส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีนแตกต่างจากการให้ความร้อน โดยความร้อนสามารถทำลายพันธะที่ไม่แข็งแรงที่อยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีนปฐมภูมิ ทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ ซึ่งได้แก่พันธะไฮโดรเจน ในขณะที่การให้ความดันจะมีผลต่อพันธะไฮโดรโฟบิกและแรงกระทำระหว่างประจุแต่ความดันไม่มีผลต่อพันธะไฮโดรเจน ดังนั้นกลไกในการคลายเกลียวและการรวมตัวกันของโปรตีนจึงมีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างที่ให้ความร้อนและตัวอย่างที่ให้ความดัน ซึ่งส่งผลให้คุณลักษณะเนื้อสัมผัสของตัวอย่างมีความแตกต่างกัน (Angsupanich and Ledward, 1998)



ภาพที่ 9 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) และความร้อน (อุณหภูมิ100 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที) ต่อค่าแรงเฉือนและแรงกดของเนื้อกุ้งกุลาดำ

The influence of high pressure (200-800 MPa, 20 min) and heat treatment (100 °C, 2 min) on shear force and compression force of black tiger shrimp muscle.

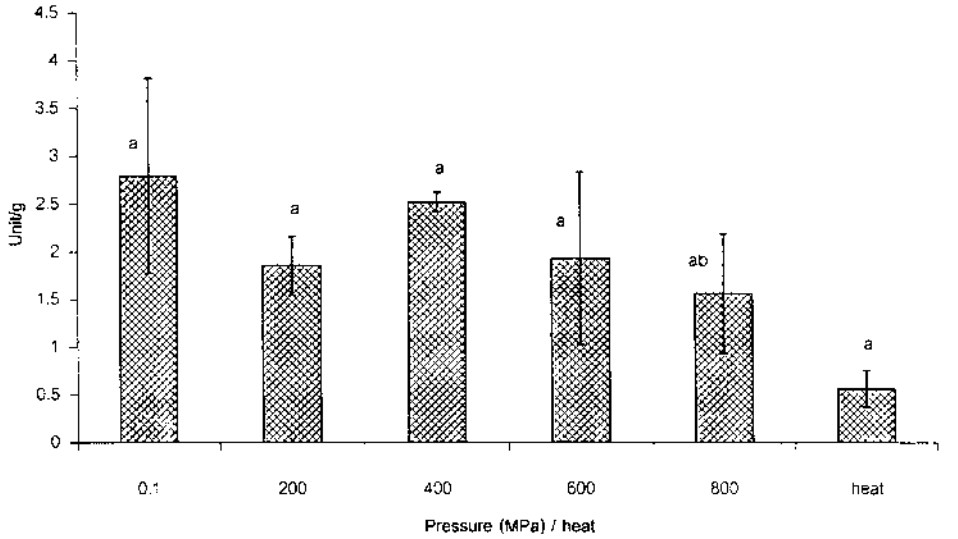
The same letters or capital letters under the same parameter indicate non significant differences ($p \geq 0.05$).

Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

2.4 กิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง

ผลของความดันและความร้อนต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกุ้งกุลาดำแสดงดังภาพที่ 10 เมื่อทำการวัดกิจกรรมรวมของเอนไซม์โปรติเอสในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำที่สภาวะที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด ซึ่งได้แก่ ที่สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่าง 8.0 (ดังแสดงในภาพประกอบภาคผนวกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) พบว่าความดันมีผลเพียงเล็กน้อยต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ($p \geq 0.05$) ส่วนตัวอย่างที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลง ($p < 0.05$) การให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล มีแนวโน้มทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความดันทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อก่อนเกิดการแตกออกของไลโซโซม (Homma *et al.*, 1994) หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับการให้ความดันจนถึง 400 เมกกะปาสคาลซึ่ง

อาจเกิดจากความดันที่ระดับนี้ทำลายเยื่อหุ้มของไลโซโซม (lysosomal membrane) ซึ่งส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยเอนไซม์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้น Ohmori และคณะ (1991) พบว่าความดันที่ระดับสูงกว่า 200 เมกกะปาสคาล ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยเอนไซม์จากไลโซโซมในกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงทำให้เกิดการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส แต่อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในกุ้งกุลาดำที่ให้ความดันมากกว่า 400 เมกกะปาสคาลจะลดลงเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความดัน 800 เมกกะปาสคาลมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่ให้ความร้อน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ohmori และคณะ (1991) ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ neutral protease จากเนื้อวัวจะลดลงเมื่อให้ความดันสูงกว่า 400 เมกกะปาสคาล อย่างไรก็ตาม Simpson (1998) รายงานว่า การกลับมามีกิจกรรมอีกครั้งของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับระดับของการให้ความดัน ซึ่งได้แก่ความดันที่ระดับ 100-400 เมกกะปาสคาล และยังขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์โปรติเอส Angsupanich และ Ledward (1998) พบว่าการให้ความดันมากกว่า 500 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ไม่สามารถทำให้เอนไซม์ alkaline protease จากเนื้อปลาคอดสูญเสียกิจกรรมได้ ส่วนเอนไซม์ acid protease มีกิจกรรมลดลงเล็กน้อยเมื่อให้ความดันที่ตั้งแต่ 400 เมกกะปาสคาล ขึ้นไป Ashie และ Lanier (2000) รายงานว่า ความดันมีผลในหลายๆ ขั้นตอนของการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งได้แก่ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจับกันของเอนไซม์และซับสเตรท หรือการจับกับลิแกนด์ การเปลี่ยนแปลงอันตรกิริยา การเปลี่ยนแปลงสภาวะกระตุ้น การรวมตัวหรือการแยกตัวของโปรตีนหน่วยย่อย การเสียสภาพ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในการจับกับซับสเตรท กระบวนการเปลี่ยนแปลงปริมาตรที่เกี่ยวข้องกับการจับของลิแกนด์ อาจส่งเสริมให้เกิดขึ้นหรือเกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ด้วยความดัน ส่วนในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความร้อนพบว่าความร้อนสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้เกือบสมบูรณ์ ทั้งนี้เกิดจากความร้อนทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน ส่งผลให้สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (Damodaran, 1996)



ภาพที่ 10 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) และความร้อน (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที) ต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองที่สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 ของเนื้อกุ้งกุลาดำ

The influence of high pressure (200-800 MPa, 20 min) and heat treatment (100 °C, 2 min) on autolytic activity at 60 °C, pH 8.0 in black tiger shrimp muscle.

The same letters under indicate non significant differences ($p \geq 0.05$).

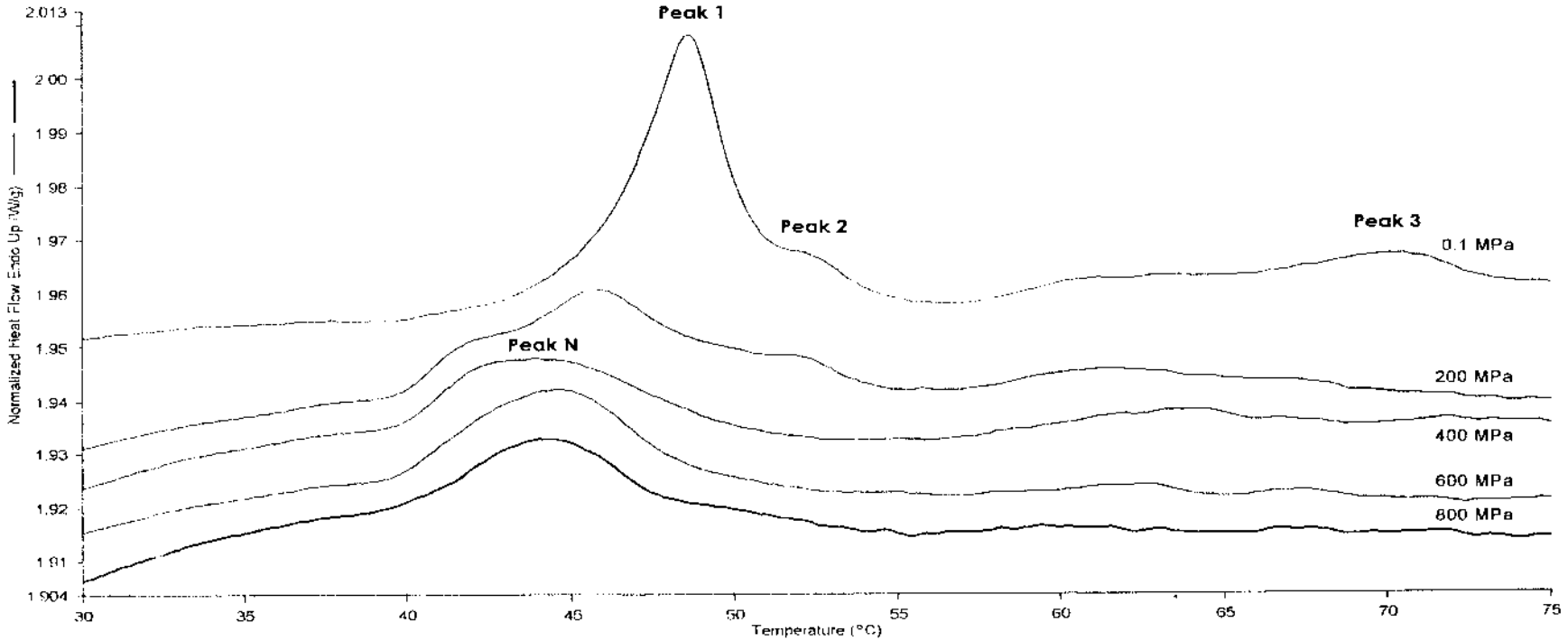
Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

2.5 การเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนด้วยความดันสูง

จากการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนกุ้งกุลาดำด้วยความดันสูง โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) จะได้ DSC เทอร์โมแกรม (thermograms) ของกุ้งกุลาดำแสดงดังภาพที่ 11 Srinivasan และคณะ (1997) ได้ระบุถึงชนิดของโปรตีนที่เกิดการเสียสภาพจาก DSC เทอร์โมแกรมของกุ้ง (*Machrobrachium rosenbergii*) ได้ดังนี้ peak ที่ 1 เกี่ยวกับการเสียสภาพของโปรตีนไมโอซินที่อุณหภูมิสูงสุด 50.5 องศาเซลเซียส peak ที่ 2 ที่อุณหภูมิ 54.9 องศาเซลเซียส คือ อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนไมโอซิน โปรตีนซาร์โคพลาสมิกและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และ peak ที่ 3 ที่อุณหภูมิ 67.7 องศาเซลเซียส คือ อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนแอกติน จาก DSC เทอร์โมแกรมของตัวอย่างในชุดควบคุม (0.1 เมกกะปาสคาล) ปรากฏ peak แบบ endothermic ทั้งหมด 3 peak ที่อุณหภูมิสูงสุด (T_{max}) 48.67 (peak 1) 51.96 (peak 2) และ 70.17 (peak 3) องศาเซลเซียส (ดังตารางที่ 6) ดังนั้นจึงอาจจะเกี่ยวข้องกับการเสียสภาพของโปรตีนไมโอซิน โปรตีนไมโอซินรวมทั้งโปรตีนซาร์โคพลาสมิกและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และโปรตีนแอกติน

ตามลำดับ ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ไม่ปรากฏ peak ของไมโอซินและแอกติน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไมโอซินส่วนใหญ่และแอกตินเกิดการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ด้วยความดันตั้งแต่ 200 เมกกะปาสคาล แต่ยังปรากฏ peak ของโปรตีนไมโอซิน โปรตีนซาร์โคพลาสมิกและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หลังจากให้ความดันตั้งแต่ 400 เมกกะปาสคาลขึ้นไป จะไม่ปรากฏ peak ที่ 1 2 และ 3 แสดงให้เห็นว่าความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาลทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อกุ้ง การให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล ทำให้โปรตีนไมโอซินและแอกตินในกุ้งกุลาดำเกิดการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ซึ่งมีระดับต่ำกว่าการเสียสภาพของโปรตีนไมโอซินและแอกตินในเนื้อหมูซึ่งเกิดการเสียสภาพภายหลังจากให้ความดันที่ระดับ 300-400 เมกกะปาสคาล (Cheah and Ledward, 1996) และโปรตีนไมโอซินในเนื้อปลาคอดเกิดการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์เมื่อให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล ขณะที่แอกตินเกิดการเสียสภาพหลังจากให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล (Angsupanich and Ledward, 1998) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนแอกตินในกุ้งกุลาดำมีความไวต่อการเสียสภาพด้วยความดันมากกว่าปลาคอด นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างที่ให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล จะปรากฏ peak ที่ตำแหน่งอุณหภูมิใหม่ที่อุณหภูมิ 42 และ 45.83 องศาเซลเซียส ส่วนในชุดการทดลองที่ให้ความดันตั้งแต่ 400 เมกกะปาสคาลขึ้นไป จะปรากฏ peak ใหม่ (peak N) ที่มีอุณหภูมิสูงสุดเท่ากับ 44.0 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าอุณหภูมิในการเสียสภาพของโปรตีนไมโอซินตามธรรมชาติ (native myosin) (48.67 องศาเซลเซียส) จากตารางที่ 6 และ 7 แสดงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูงสุดที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน (T_{max}) กับเอนทาลปีที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน (ΔH) จะเห็นว่าอุณหภูมิในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส ทำให้โปรตีนไมโอซินเกิดการเสียสภาพและเกิดการสร้างโครงสร้างแบบใหม่อันเนื่องมาจากความดัน (peak N) อย่างไรก็ตามเอนทาลปีที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของ peak N จะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน เช่นเดียวกับรายงานของ Angsupanich และ Ledward (1999) พบว่าการให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาลแก่เนื้อปลาคอดและเนื้อไก่งวงทำให้ เอนทาลปีของโปรตีนทุกชนิดลดลง และเมื่อให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล peak อื่นๆ จะไม่ปรากฏ แต่จะปรากฏ peak N ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบใหม่ที่มีความคงตัวต่ำกว่า นอกจากนี้ Angsupanich และ Ledward (1998) รายงานว่าโครงสร้างแบบใหม่ (peak N) สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อให้ความดันแก่เนื้อปลาคอดที่ระดับ 100 เมกกะปาสคาลหรือมากกว่า และการเพิ่มระดับความดันถึง 800 เมกกะปาสคาล มีผลต่อโครงสร้างนี้เพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มระดับความดันไม่มีผลต่อพลังงานในการคลายเกลียว (unfold) ของโครงสร้างใหม่ที่ถูกสร้างขึ้น โดยความดันทำให้เกิดการสลายแรงกระทำระหว่างประจุและพันธะไฮโดรโฟบิก รวมทั้งทำให้เกิดการแตกออกของพันธะไฮโดรเจน แต่อย่างไรก็ตามภายหลังจากการปลดปล่อยความดันพันธะไฮโดรเจนจะถูกสร้างขึ้นเป็น

อันดับแรก แรงกระทำระหว่างประจุและพันธะ ไฮโดรโฟบิกอาจถูกสร้างขึ้นภายหลัง จึงทำให้โครงสร้างหลักที่เกิดขึ้นภายหลังจากการให้ความดันจึงเป็นโครงข่ายของพันธะไฮโดรเจน ในขณะที่การให้ความร้อนทำให้เกิดการทำลายพันธะไฮโดรเจนก่อนแล้วอาจเกิดการทำลายแรงกระทำระหว่างประจุหรือพันธะไฮโดรโฟบิก แต่เมื่อทำให้เย็นแรงกระทำระหว่างประจุและพันธะไฮโดรโฟบิกจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนพันธะไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นภายหลัง



ภาพที่ 11 DSC เทอร์โมแกรมของกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับต่างๆ นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะที่มีอากาศ ทำการให้ความร้อนโดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที โดย peak ที่ 1 คือ ไมโอซิน peak ที่ 2 คือ ไมโอซิน โปรตีนซาร์โคพลาสมิก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน peak ที่ 3 คือ แอกติน และ peak N คือ โปรตีนที่จัดเรียงตัวใหม่เนื่องมาจากความดัน

DSC thermograms of black tiger shrimp muscle subjected to different pressures in air for 20 min at ambient temperature. Peak 1 corresponds to myosin peak 2 could be attributed to myosin, sarcoplasmic proteins, and connective tissue, and peak 3 corresponds to actin. Peak N represents a protein rearranged after pressure treatmen

ตารางที่ 6 อุณหภูมิสูงสุดที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับต่างๆ

Peak transition temperature (T_{max}) for the proteins in pressurized black tiger shrimp muscle.

Treatment	T_{max} (°C)			
	Peak N	Peak 1	Peak 2	Peak 3
0.1 MPa	Not seen	48.67	51.96	70.17
200 MPa	45.83	Indistinct	51.79	Indistinct
400 MPa	44.00	Indistinct	Indistinct	Indistinct
600 MPa	44.67	Indistinct	Indistinct	Indistinct
800 MPa	44.33	Indistinct	Indistinct	Indistinct

Peak N: assumed to be associated with a structure formed following myosin denaturation.

Peak 1: corresponds to the first peak of myosin denaturation.

Peak 2: corresponds to myosin, sarcoplasmic protein, and connective tissue denaturation.

Peak 3: corresponds to actin denaturation.

ตารางที่ 7 ผลของความดันต่อค่าเอนทาลปีที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ (จูล/กรัมของน้ำหนักตัวอย่างเปียก)

The effect of high pressure treatment on relative enthalpy of protein denaturation in black tiger shrimp muscle (joules/gram wet sample).

Treatment	ΔH_N	ΔH_1	ΔH2	ΔH_3
0.1 MPa	0	1.314	0.01	0.128
200 MPa	0.920	Indistinct	0.022	Indistinct
400 MPa	0.615	Indistinct	Indistinct	Indistinct
600 MPa	0.702	Indistinct	Indistinct	Indistinct
800 MPa	0.607	Indistinct	Indistinct	Indistinct

ΔH_N: enthalpy of denaturation for new peak.

ΔH_1: enthalpy of denaturation for myosin.

ΔH_2: enthalpy of denaturation for myosin, sarcoplasmic protein and connective tissue.

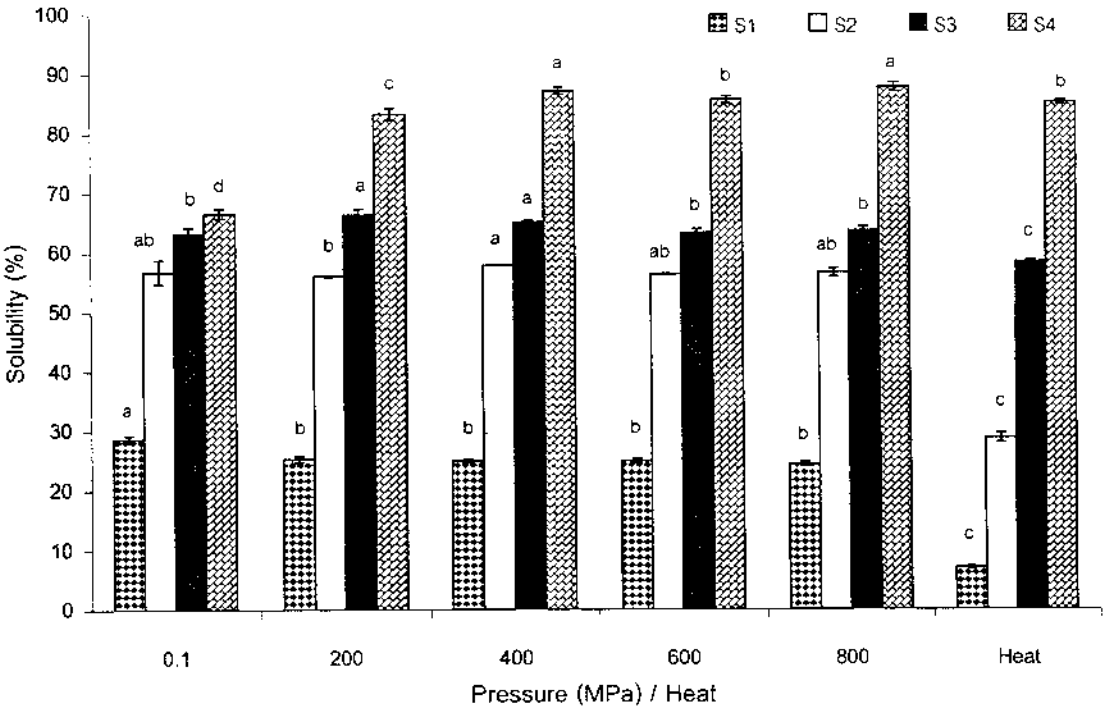
ΔH_3: enthalpy of denaturation for actin.

2.6 **การละลายของโปรตีน**

จากภาพที่ 12 แสดงค่าการละลายของโปรตีนกุ้งกุลาดำ ในสารละลายต่างๆ ดังนี้ สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.6 โมลาร์ (S1) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 1 (S2) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 1 และ สารละลายยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ (S3) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 1 สารละลายยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ และสารละลายเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล ร้อยละ 2 (S4) โดยสารละลาย S1 จะสามารถละลายโปรตีนไมโอไฟบริลตามธรรมชาติ สารละลาย S2 สามารถละลายโปรตีนที่รวมตัวกันด้วยพันธะไอออนิกและพันธะไฮโดรเจน สารละลาย S3 สามารถละลายโปรตีนที่รวมตัวกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและพันธะไฮโดรโฟบิก และสารละลาย S4 สามารถละลายโปรตีนที่รวมตัวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Chawla *et al.*, 1996) จากการทดลองพบว่าค่าการละลายของโปรตีนในสารละลาย S1 ในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดันค่าจะลดลงเป็นลำดับ และค่าการละลายของโปรตีนในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความร้อนจะมีค่าต่ำสุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อให้ความดันเพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนได้มากขึ้น ทำให้มีปริมาณไมโอไฟบริลตามธรรมชาติลดลง Okamoto และคณะ (1990) รายงานว่าความดันทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนซึ่งเป็นผลมาจากการลดลงของปริมาตรของสารละลายโปรตีน โดยความดันทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ และ/หรือ ทำให้เกิดการเสียโครงสร้างของพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ ซึ่งได้แก่พันธะไฮโดรเจน พันธะไฮโดรโฟบิก และพันธะไอออนิกที่อยู่ในโครงสร้างของโปรตีนตติยภูมิ ในขณะที่ไม่มีผลต่อพันธะโควาเลนต์ ส่วนการให้ความร้อนทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลอย่างรุนแรง ซึ่งนำไปสู่การทำลายทั้งพันธะโควาเลนต์ และพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์

ค่าการละลายในสารละลาย S2 ของตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันมีค่าเพิ่มขึ้นจากสารละลาย S1 ในสัดส่วนที่สูงกว่าตัวอย่างในชุดควบคุมและตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อน และในสารละลาย S3 ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันมีการเพิ่มขึ้นของค่าการละลายจากสารละลาย S2 ในสัดส่วนที่สูงกว่าตัวอย่างในชุดควบคุมและต่ำกว่าตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อน ในสารละลาย S4 ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันมีการเพิ่มขึ้นของค่าการละลายจากสารละลาย S3 ในสัดส่วนที่สูงกว่าตัวอย่างในชุดควบคุมและแต่ต่ำกว่าตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อน แสดงให้เห็นว่า ความดันส่งเสริมให้เกิดการสร้างพันธะ โดยมีพันธะไฮโดรเจนในสัดส่วนที่สูงเมื่อเทียบกับพันธะไฮโดรโฟบิกและพันธะไดซัลไฟด์ ส่วนผลของความร้อนซึ่งมีสัดส่วนของพันธะไฮโดรโฟบิก และพันธะไดซัลด์ที่สูงกว่าการเกิด

พันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ Messens และคณะ (1997) รายงานว่าพันธะไฮโดรเจนจะถูกสร้างขึ้นได้ภายใต้สภาวะการให้ความดันเมื่อมีการลดลงของปริมาตรเพียงเล็กน้อย พันธะไฮโดรเจนมีความคงตัวต่อความดันสูง ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการทดลองในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนด้วยความดันสูง จาก DSC เทอร์โมแกรม (ภาพที่11) การให้ความดันทำให้เกิด Peak N ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโครงข่ายของพันธะไฮโดรเจน ซึ่งมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนตามธรรมชาติ นอกจากนี้ Angsupanich และ Ledward (1998) รายงานว่าขณะที่ปลดปล่อยความดันทำให้เกิดการสร้างขึ้นของพันธะไฮโดรเจน ดังนั้นจึงทำให้อัตราการละลายในสารละลาย S2 ของโปรตีนในตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนมีค่าต่ำที่สุดเนื่องจากพันธะไฮโดรเจน ไม่คงตัวภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (Damodaran, 1996) Ikeuchi และคณะ (1992) รายงานว่าความดันทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่าไฮโดรโฟบิกพื้นผิว (Surface hydrophobicity) เนื่องจากความดันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไมโอซิน นอกจากนี้ Yamamoto และคณะ (1994) รายงานว่าค่าไฮโดรโฟบิกพื้นผิวของโมเลกุลไมโอซินที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อให้ความดันเพิ่มขึ้นจาก 100-200 เมกกะปาสคาล และจะมีค่าคงที่เมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดันจาก 250 เป็น 500 เมกกะปาสคาล และพบว่าการให้ความร้อนทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่าไฮโดรโฟบิกพื้นผิว โดยการให้ความร้อนทำให้เกิดการทำลายพันธะไฮโดรโฟบิกแต่ภายหลังจากการทำให้เย็นพันธะไฮโดรโฟบิกจะถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็ว (Angsupanich and Ledward, 1999) ภายใต้สภาวะการให้ความดันและการให้ความร้อนส่งเสริมให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ โดยความดันทำให้เกิดการคลายตัวของโครงสร้างโปรตีน ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (Messens *et al.*, 1997) Berg และคณะ (1965 อ้างโดย Gilleland *et al.*, 1997) พบว่าพันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดเจลของซูริมิจากปลา Alaska pollack โดยการใช้ความดันสูงที่ระดับ 300 เมกกะปาสคาล สามารถเพิ่มจำนวนของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของไมโอซินที่ใช้ในการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ นอกจากนี้ Angsupanich และ Ledward (1999) รายงานว่าทั้งการให้ความดันและการให้ความร้อนแก่เนื้อปลาคอดสามารถทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์



ภาพที่ 12 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) และความร้อน (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที) ต่อค่าการละลายของโปรตีนของเนื้อกุ้งกุลาดำ

The effect of high pressure (200-800 MPa, 20 min) and heat treatment (100 °C, 2 min) on protein solubility of black tiger shrimp muscle.

The same letters under the same solubilizing mixture indicate non significant differences ($p \geq 0.05$).

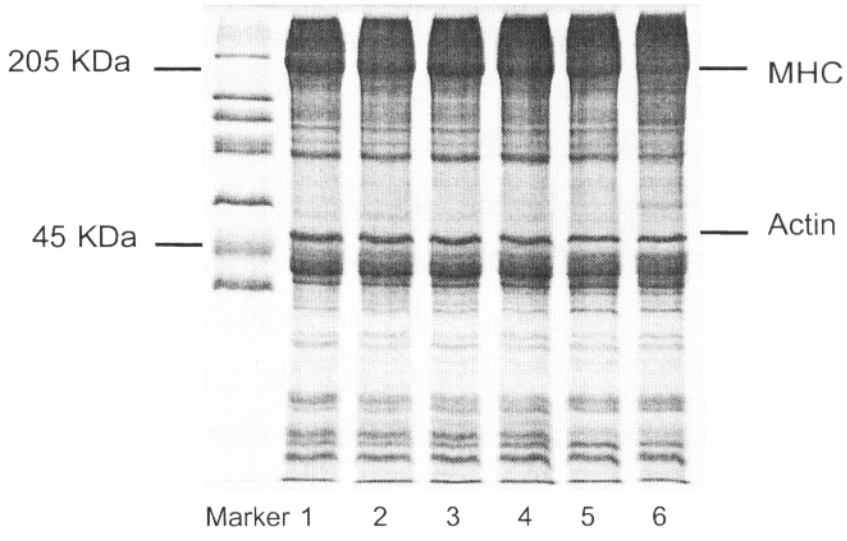
Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

2.7 รูปแบบของโปรตีนไมโอไฟบริล

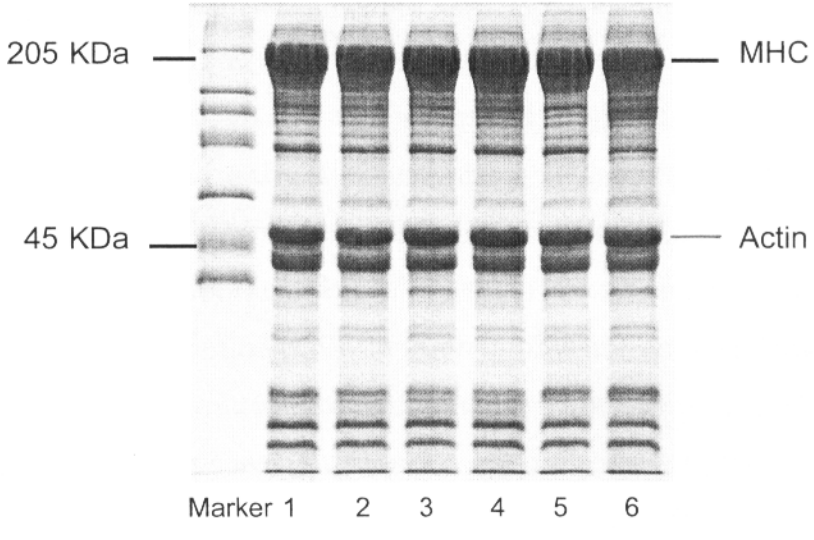
ทำการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนไมโอไฟบริลของตัวอย่างกุ้งกุลาดำ โดยใช้วิธี SDS-PAGE แบบนอนรีดิวซิง (non-reducing) (แสดงดังภาพที่ 13A) พบว่าเกิดการลดลงของแถบโปรตีนไมโอซินเส้นหนัก (Myosin heavy chain, MHC) ในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันโดยเฉพาะที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล พบว่ามีการจางลงของแถบโปรตีน MHC อย่างชัดเจน และจากภาพที่ 13B ซึ่งเป็นชุดการทดลองแบบรีดิวซิง (reducing) ซึ่งมีการเติม β-mercaptoehanol ซึ่งสามารถทำลายพันธะ ไดซัลไฟด์ พบว่าแถบโปรตีน MHC ในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันและชุดควบคุมไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการให้ความดันที่ระดับสูงถึง 800 เมกกะปาสคาล ส่งผลให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองค่าการละลายของโปรตีน (ภาพที่ 12) และสอดคล้อง

กับการทดลองของ Angsupanich และ Ledward (1999) ซึ่งพบว่าการให้ความดันตั้งแต่ 600 เมกกะปาสคาล ทำให้เกิดการลดลงของแถบโปรตีน MHC ในชุดการทดลองแบบนอนรีดิวซิง แต่ไม่มีความแตกต่างของแถบโปรตีน MHC ในชุดการทดลองแบบรีดิวซิง เนื่องจากความดันทำให้เกิดการคลายเกลียว ทำให้มีหมู่ซัลฟ์ไฮดริลเพิ่มขึ้นและเมื่อเกิดการออกซิเดชันของหมู่ดังกล่าวจึงส่งผลให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (Gilleland *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบแถบของโปรตีน MHC ในชุดการทดลองที่มีการให้ความร้อน พบว่าแถบของโปรตีน MHC จางลงมากกว่าชุดการทดลองในสภาวะอื่น ทั้งในชุดการทดลองแบบนอนรีดิวซิงและรีดิวซิง แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนทำให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ แต่การให้ความร้อนอาจทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ภาพประกอบภาคผนวกที่ 1) การย่อยสลายโปรตีนทำให้โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลลดลง (Visessanguan and An, 2000) ส่งผลให้เกิดการจางลงของแถบโปรตีน MHC การย่อยสลายโปรตีนสามารถเกิดได้ทั้งในระหว่างการเก็บรักษาและในระหว่างการแปรรูป (Asghar and Bhatti, 1987 อ้างโดย Visessanguan and An, 2000)

(A)



(B)



ภาพที่ 13 รูปแบบของโปรตีนโดย SDS-PAGE ของกุ้งกุลาดำที่ผ่านการลอกชั้นเนื้อเยื่ออิพิธีเลียมในสภาวะผ่านความดันสูง {0.1 (แถบ 1) 200 (แถบ 2) 400 (แถบ 3) 600 (แถบ 4) และ 800 (แถบ 5) เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที} หรือความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (แถบ 6) โดย A เป็นโปรตีนที่ไม่มีเบต้าเมอแคปโตเอธานอล และ B เป็นโปรตีนที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล MHC: ไมโอซินเส้นหนัก

SDS-PAGE pattern of protein in the absence of β-mercaptoehanol (A) and in the presence of β-mercaptoethanol (B) for black tiger shrimp muscle without muscular epithelium after treated at different pressures for 20 min {0.1 (lane 1), 200 (lane 2), 400 (lane 3), 600 (lane 4), 800 (lane 5) MPa} or heating at 100 ^{0}C for 20 min (lane 6). MHC, myosin heavy chain.

3. ผลของความดันต่อคุณภาพของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษา

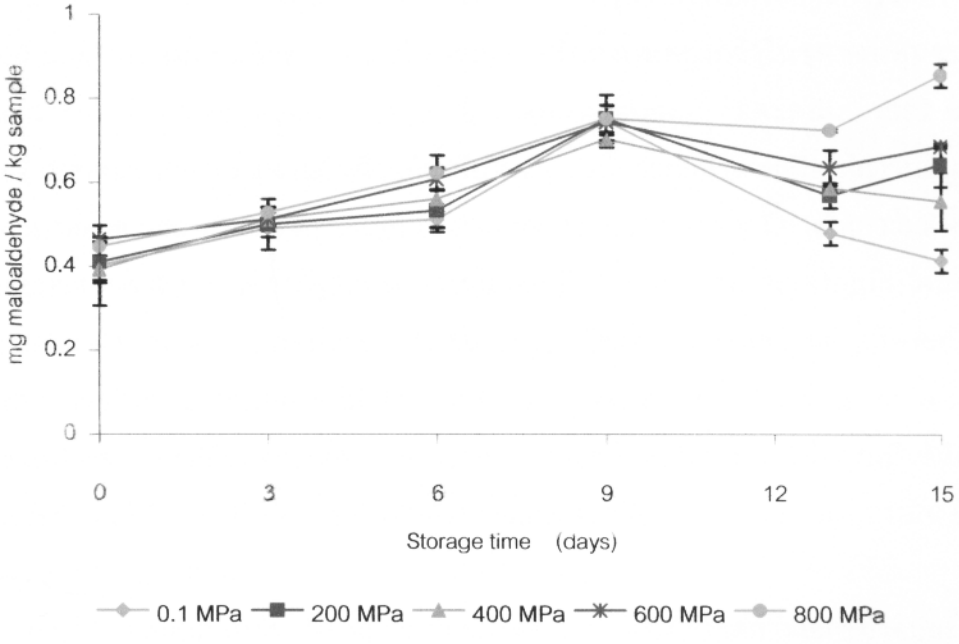
3.1 **ค่า** Thiobarbituric Acid Reactive substance (TBARS)

ผลของความดันต่อค่า TBARS ของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน (ดังภาพที่ 14) พบว่าค่า TBARS ของตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับต่ำกว่า 600 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที มีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างในชุดควบคุม แต่เมื่อให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาลขึ้นไป พบว่าค่า TBARS มีค่าสูงกว่าตัวอย่างในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Angsupanich และ Ledward (1998) พบว่าการให้ความดันที่ระดับ 600 และ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที แก่เนื้อปลาคอดทำให้ค่า Thiobabuturic acid (TBA) มีค่าสูงกว่าตัวอย่างในชุดควบคุมและตัวอย่างที่ให้ความดันที่ระดับต่ำกว่า ($p<0.05$) รวมทั้งการทดลองของ Ohshima และคณะ (1992 อ้างโดย Angsupanich and Ledward, 1998) ซึ่งพบว่าการให้ความดันในช่วง 200-600 เมกกะปาสคาล นาน 15-20 นาที แก่ปลาคอด ทำให้ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value, PV) ของน้ำมันที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับและระยะเวลาในการให้ความดัน Cheah และ Ledward (1997) รายงายว่าการออกซิเดชันของไขมันหมูจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้ความดันตั้งแต่ 600 เมกกะปาสคาลขึ้นไป Tanaka และคณะ (1991) ได้นำน้ำมันปลาซาร์ดีน (sardine) ผสมกับเนื้อปลาซาร์ดีนที่ผ่านการกำจัดไขมันแล้วมาให้ความดันที่ระดับ 108 เมกกะปาสคาล นาน 30-60 นาที พบว่าค่า PV และ TBA ของตัวอย่างที่ผ่านการเก็บที่ 5 องศาเซลเซียส มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ผ่านการให้ความดันและมีค่ามากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการให้ความดันเพิ่มขึ้น และพบว่าการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันปลาซาร์ดีนจะถูกเร่งโดยความดันเมื่อมีกล้ามเนื้อปลา นอกจากนี้การเสียสภาพของโปรตีนอาจมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการเร่งออกซิเดชันของไขมันในเนื้อที่ผ่านการให้ความดัน (Wada, 1992) โดย Cheah and Ledward (1997) พบว่าความดันตั้งแต่ 300-400 เมกกะปาสคาลโปรตีนไมโอไฟบริลและโปรตีนซาร์โคพลาสมิกส่วนใหญ่จะเกิดการเสียสภาพ และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไมโอโกลบินหรือออกซีไมโอโกลบินให้อยู่ในรูปเหล็กที่เสียสภาพ (denatured ferric) และยังพบว่าความดันมีผลไปปลดปล่อยไอออนของโลหะจากโลหะที่อยู่ในรูปเชิงซ้อน ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาณโลหะอิสระ ซึ่งได้แก่ เหล็ก และทองแดง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเนื้อหมูมีความคล้ายคลึงกับในตัวอย่างปลาคอด โดยการเติม EDTA ร้อยละ 1 ลงในปลาคอด ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในปลาคอดที่ผ่านการให้ความดันที่ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ในสภาวะที่มีอากาศ (Angsupanich and Ledward, 1998) Cheah และ Ledward (1996) พบว่าเนื้อบดที่ให้ความดันในสภาวะที่มีอากาศมีค่า TBA เริ่มต้นสูงกว่าตัวอย่างที่ให้ความดันสภาวะที่มีไนโตรเจน แต่

เมื่อนำไปเก็บในสภาวะที่มีอากาศพบว่าอัตราการเกิดออกซิเดชันเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่าการเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่ได้ขึ้นกับการมีออกซิเจนขณะที่ทำการให้ความดัน ดังนั้นผลของความดันสูงต่อความคงตัวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อจะขึ้นอยู่กับการมีออกซิเจน องค์ประกอบของกล้ามเนื้อและอุณหภูมิของตัวอย่าง (Cheftel and Culioli, 1997)

ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งกุลาดำในสภาวะที่มีอากาศที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน พบว่าค่า TBARS ของตัวอย่างในทุกชุดการทดลองเพิ่มขึ้นตามลำดับจนถึงวันที่ 9 ของการเก็บรักษา แต่ภายหลังจากการเก็บรักษานาน 9 วัน ตัวอย่างในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดัน 200 400 เมกกะปาสคาล และชุดควบคุม มีค่า TBARS ลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่ค่า TBARS ของตัวอย่างในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดัน 600 และ 800 เมกกะปาสคาล มีค่าลดลงเมื่อทำการเก็บรักษานาน 9 วัน และจะมีค่าเพิ่มขึ้นภายหลังจากการเก็บรักษานาน 13 วัน จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการเก็บรักษา Branen (1978 อ้างโดย Rhee และคณะ, 1997) รายงานว่าการลดลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาอาจเกิดจากจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาใช้สารประกอบพวกมาลอนอัลดีไฮด์ (malonaldehyde) หรือเกิดจากสารประกอบเอมีนซึ่งเป็นผลผลิตจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอัลดีไฮด์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่ใช่เอนไซม์ (nonenzymatic browning) จากผลการทดลองในส่วนของการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ (ดังภาพที่ 15) พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดัน 600 และ 800 เมกกะปาสคาล มีปริมาณจุลินทรีย์ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดัน 200 400 เมกกะปาสคาล และตัวอย่างในชุดควบคุม เมื่อทำการเก็บรักษานาน 15 วัน ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำที่สุด จึงทำให้ค่า TBARS มีค่าสูงที่สุด ส่วนตัวอย่างชุดควบคุมมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุดส่งผลให้มีค่า TBARS ต่ำที่สุด นอกจากนี้การลดลงของค่า TBA อาจมีสาเหตุมาจากสารประกอบพวกมาลอนอัลดีไฮด์สามารถจับกับองค์ประกอบอื่นในอาหาร ได้แก่ โปรตีนที่ละลายในน้ำ aldolase และไมโอซิน โดยมีความสามารถในการจับมาลอนอัลดีไฮด์ 1.3-2.6 กรัมต่อโปรตีน 1 มิลลิกรัม (Kwon *et al*,. 1965 อ้างโดย Fernández *et al*., 1997) และสามารถจับกับกรดอะมิโนในกลุ่มฮีสทีดีน (histidine) อาร์จีนีน (arginine) ไทโรซีน และเมทไธโอนีน (methionine) ได้ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความคงตัวสูง จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปริมาณของมาลอนอัลดีไฮด์ที่ตรวจด้วยวิธีการหาค่า TBA มีค่าลดลง (Fernández *et al*., 1997) อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล แม้ว่ามีค่า TBARS สูงกว่าในชุดการทดลองอื่นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แต่ยังมีค่าน้อยกว่าค่า TBA ที่ยังยอมรับได้สำหรับอาหารทั่วไปซึ่งมีค่าไม่เกิน 20 มิลลิกรัมมาลอนอัลดีไฮด์

ต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม (Shamberger *et al.*, 1997) โดยทั่วไปในอาหารแต่ละชนิดมีค่า TBA ที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้กลิ่นหืนได้แตกต่างกัน เช่น Tarladgis และคณะ (1960) รายงานว่าผู้ทดสอบรับรู้กลิ่นหืนในเนื้อหมูบดสุก เมื่อ TBA มีค่า 0.5-1.0 มิลลิกรัมของสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยากับ TBA ต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม สำหรับปลาแช่เยือกแข็งและปลากระป๋องพบว่ายังมีคุณภาพดีเมื่อ TBA มีค่าน้อยกว่า 3.0 มิลลิกรัมของสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยากับ TBA ต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม แต่ก็ยังยอมรับได้เมื่อค่า TBA เพิ่มขึ้นเป็น 4-27 มิลลิกรัมของสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยากับ TBA ต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม (Greene and Cumeze, 1981)



ภาพที่ 14 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) ต่อค่า TBARS ของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

The effect of high pressure (200-800 MPa, 20 min) on TBARS value of black tiger shrimp muscle during storage at 4 °C.

Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

3.2 การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์

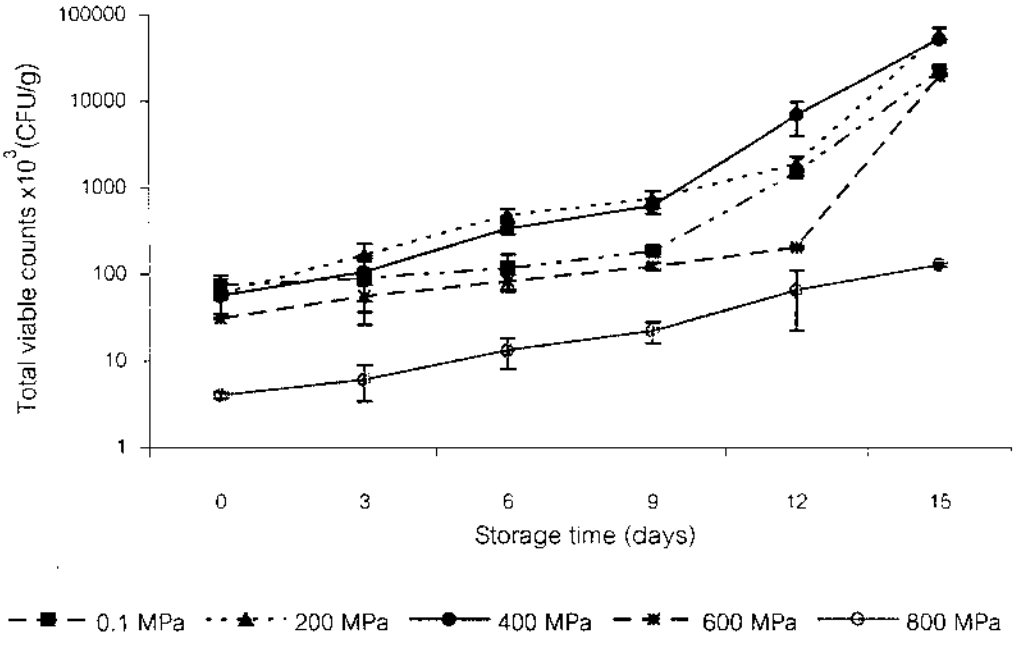
3.2.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable counts, TVC)

การให้ความดันสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของกุ้งกุลาดำ โดยปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นลดลงเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ 1.5 log unit (CFU/g) ($p<0.05$) แสดงดังภาพที่ 15 ส่วนการให้ความดันที่ระดับ 200-400 เมกกะปาสคาล ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดจะลดลงเพียงเล็กน้อย

เมื่อทำการเก็บรักษากุ้งกุลาดำนาน 3 วัน พบว่า ในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 200 และ 400 เมกกะปาสคาล มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าในชุดควบคุมจนตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา Hayakawa (1991 อ้างโดย Hayakawa และคณะ, 1992 อ้างโดย Hayakawa และคณะ 1994) รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารมักจะถูกทำลายเมื่อให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาล นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การให้ความดันที่ระดับ 450 เมกกะปาสคาล สามารถทำให้จุลินทรีย์บางชนิดที่อยู่ในเนื้อปลาสามารถเจริญเติบโตได้อีกครั้ง (regenerate) หลังจากเกิดการปลดปล่อยความดัน แต่อย่างไรก็ตามการให้ความดันเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำลายสปอร์ของแบคทีเรียได้ (Miyao *et al.*, 1993 อ้างโดย Ohshima *et al.*, 1993) จำนวนของสปอร์จะลดลงเมื่อมีการให้ความดัน 2 ขั้นตอน โดยต้องให้ความดันเพื่อส่งเสริมให้เกิดการงอกของสปอร์ และให้ความดันอีกครั้งเพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์ (Sale *et al.*, 1970 อ้างโดย Leadley and Williams, 1997)

การให้ความดันระหว่าง 50-400 เมกกะปาสคาล ส่งเสริมให้เกิดการงอกของสปอร์ แต่เมื่อให้ความดันสูงกว่าอัตราการงอกก็จะช้าลง ความดันที่ระดับ 200-400 เมกกะปาสคาล มีความเหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากความดันที่ระดับนี้สามารถทำให้เกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการงอกของสปอร์ (Mertens, 1992 อ้างโดย Leadlay and Williams, 1997) Gram และ Huss (1996 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2544) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่พบในกุ้งที่อาศัยในเขตร้อนได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มมีโซไฟล์ (mesophile) แกรมบวก ได้แก่ *Clostridium botulinum* type E, *Vibrio parahaemolyticas, V. cholerae* และ *V. vulnificus* ซึ่งเกิดการปนเปื้อนจากแหล่งน้ำ นอกจากนี้อาจปนเปื้อนระหว่างการจับและขนส่ง ซึ่งได้แก่ *Cl. perfrimgens, S. aureus, Salmonella, Shigella, Vibrio* อาจพบ *Achromobacter, Bacillus, Flavobacterium* และ *Micrococcus* จากแหล่งน้ำบริเวณชายฝั่ง ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Clostridium* และ *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ การให้ความดันที่ระดับ 200-400 เมกกะปาสคาล อาจส่งเสริมให้เกิดการงอกของสปอร์ได้ จึงส่งผลให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในชุดการทดลองที่ให้ความดัน 200 และ 400

เมกกะปาสคาล สูงกว่าในชุดควบคุมภายหลังจากการเก็บรักษานาน 3 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเก็บรักษากุ้งกุลาดำนาน 15 วัน พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลองตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรมของผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงคือกุ้งแช่เยือกแข็ง ซึ่งได้กำหนดปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน $1x10^6$ CFU/กรัมตัวอย่าง (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2533) ดังนั้นกุ้งกุลาดำที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 200 400 เมกกะปาสคาล และชุดควบคุมมีปริมาณจุลินทรีย์ภายในกำหนดเกณฑ์มาตรฐานในระยะเวลาการเก็บรักษา 9 วัน ขณะที่กุ้งกุลาดำที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 600 และ 800 เมกกะปาสคาล มีปริมาณจุลินทรีย์ภายในกำหนดเกณฑ์มาตรฐานตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 12 และ 15 วัน ตามลำดับ



ภาพที่ 15 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) ต่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของเนื้อกุ้งกุลาดำระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

The effect of high pressure (200-800 MPa, 20 min) on total viable counts of black tiger shrimp muscle during storage at 4 °C.

Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

3.2.2 **ปริมาณแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ** (psychrophilic counts)

สามารถตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำในทุกชุดการทดลองภายหลังจากทำการเก็บรักษา 3 วัน (ดังตารางที่ 8) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดันจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรียน้อยลง และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาปริมาณของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียที่สำคัญของกุ้งกุลาดำในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส คือ *Pseudomonas*, *Moraxella* และ *Acinetobacter* (Gram and Huss, 1996 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2544) Gervilla และคณะ (1996 อ้างโดย Leadley and Williams, 1997) พบว่าการให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวนเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ที่ถ่ายเชื้อ (inoculated) ลงใน ewe's milk ได้ 7 log cycle เชื้อที่พบโดยทั่วไปในเนื้อ (endogenous flora) เช่น *Pseudomonas spp.* จะมีความทนต่อความดันมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ถ่ายเชื้อลงไป (Carlez *et al.*, 1994 อ้างโดย Cheftel and Culioli, 1997) นอกจากนี้การให้ความดันที่ระดับ 400 และ 450 เมกกะปาสคาล ทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas*, *Lactobacillus* และ Coliforms อย่างสมบูรณ์ แต่สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ 3-5 log cycle สามารถทำการเก็บรักษาเนื้อได้นาน 10-15 วันที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามเซลล์ของเชื้อ *Pseudomonas spp.* สามารถตรวจพบการเจริญได้ภายหลังจากระยะการปรับตัวของเซลล์ซึ่งขึ้นกับระดับของการให้ความดัน เนื่องจากความดันไม่ได้ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* แต่ความดันทำให้เกิดความเค้น (stressed) แก่เซลล์ของจุลินทรีย์ จึงทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์สามารถเจริญได้อีกครั้ง หลังจากช่วงซ่อมแซมเซลล์ (repair phase) ในระยะเวลาการเก็บรักษา 3-9 วัน ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส (Cheftel and Culioli, 1997)

ตารางที่ 8 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) ต่อปริมาณแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำของกุ้งกุลาดำระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

The effect of high pressure (200-800 MPa, 20 min) on psychrophilic counts of black tiger shrimp muscle during storage at 4 °C.

Pressure	Psychrophilic counts (CFU/g)					
(MPa)	0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
0.1	<100	<100	$1.88X10^4$	$8.10X10^5$	$1.60X10^6$	$2.62X10^7$
200	<100	<100	$1.73X10^4$	$6.95X10^5$	$1.66X10^6$	$1.69X10^7$
400	<100	<100	$1.05X10^4$	$1.60X10^5$	$3.60X10^5$	$7.70X10^6$
600	<100	<100	$1.69X10^4$	$3.10X10^4$	$2.52X10^5$	$1.83X10^6$
800	<100	<100	$5.45X10^3$	$2.08X10^4$	$6.70X10^4$	$3.8X10^5$

All values are the mean from triplicate determinations.

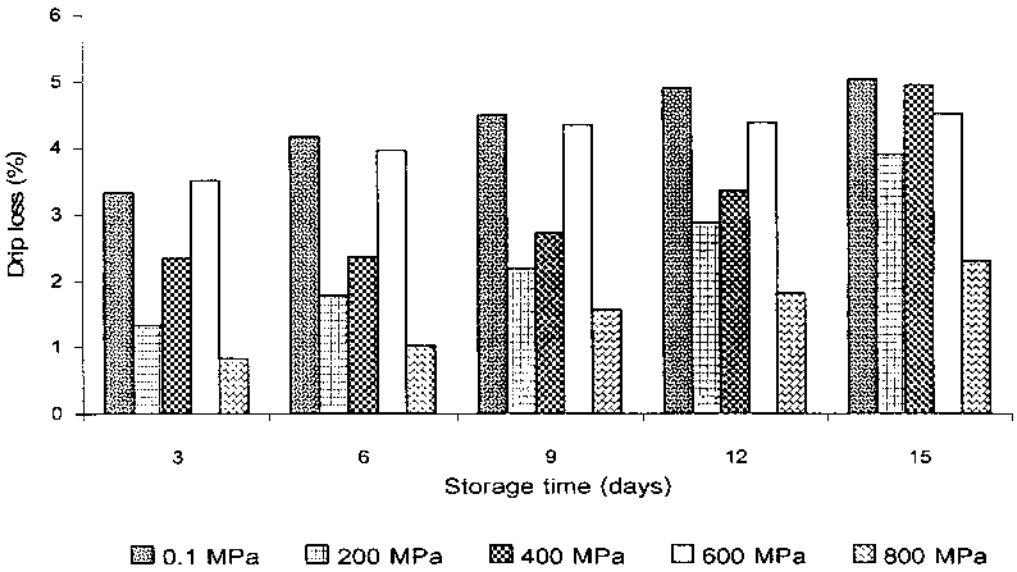
3.2.3 **ตรวจสอบเชื้อ** *Salmonella spp.*

ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella spp.* ในทุกชุดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรมของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่เยือกแข็ง ซึ่งกำหนดว่าต้องไม่พบเชื้อ *Salmonella spp.*ในตัวอย่าง 25 กรัม (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2533) ดังนั้นกุ้งกุลาดำในทุกชุดการทดลองอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานดังกล่าวตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 15 วัน

Patterson และคณะ (1995 อ้างโดย Cheftel และ Culioli, 1997) พบว่า การให้ความดันที่ระดับ 450 เมกกะปาสคาล นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวนเชื้อ *Salmonella enteritidis* ที่ถ่ายเชื้อ (inoculated) ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ได้มากกว่า 5 log cycle นอกจากนี้ Metrick และคณะ (1983 อ้างโดย Leadley และ Williams, 1997) พบว่า เมื่อให้ความดันที่ระดับ 242-345 เมกกะปาสคาล ที่อุณหภูมิห้องแก่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 63 มิลลิโมลาร์ (ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0) และใน chicken medium พบว่าเชื้อ *Salmonella sentenberg* 775 w ($D_{57.5°C}$ = 3.0 นาที) และเมื่อเพิ่มระดับการให้ความดันพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการทนความร้อนของจุลินทรีย์ไม่มีความสัมพันธ์กับการทนความดันของจุลินทรีย์

3.3 **ค่าการสูญเสียน้ำหนัก** (drip loss)

ผลของความดันและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อค่าการสูญเสียน้ำหนักของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพที่ 16 ค่าการสูญเสียน้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่ผ่านการให้ความดันจะเกิดขึ้นมากภายหลังจากการให้ความดันและภายหลังการเก็บรักษานาน 3 วัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่ให้ความดันระดับ 600 เมกกะปาสคาล มีอัตราการสูญเสียน้ำในช่วงแรกสูงและจะมีอัตราการสูญเสียน้ำลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา ขณะที่ตัวอย่างที่ให้ความดันระดับ 800 เมกกะปาสคาล มีค่าการสูญเสียน้ำหนักในระหว่างการเก็บรักษาต่ำกว่าตัวอย่างในสภาวะอื่น ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความดันระดับ 800 เมกกะปาสคาล ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนและเกิดการสูญเสียน้ำภายหลังการให้ความดันมากกว่าตัวอย่างที่ให้ความดันระดับต่ำกว่า จึงทำให้ตัวอย่างมีน้ำหลงเหลือในปริมาณน้อย ส่งผลให้ตัวอย่างเกิดการสูญเสียน้ำหนักในระหว่างการเก็บรักษาได้น้อยกว่าตัวอย่างในสภาวะอื่น Hurtado และคณะ (2001) พบว่าค่าการสูญเสียน้ำหนักในระหว่างการเก็บรักษาอาจเกิดจากความดันทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน จึงทำให้เกิดการสูญเสียน้ำออกจากโครงสร้างของโปรตีน การสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่างจะเพิ่มเล็กน้อยในอัตราที่คงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 12 วัน ตัวอย่างในชุดควบคุมและที่ให้ความดันที่ระดับ 200 และ 400 เมกกะปาสคาล มีอัตราการสูญเสียน้ำในอัตราที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยที่ตัวอย่างในชุดควบคุมมีค่าการสูญเสียน้ำหนักสูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนกล้ามเนื้อกุ้งเกิดการย่อยสลายตัวเองในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งตัวอย่างในชุดควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสหลงเหลือในกล้ามเนื้อกุ้งในปริมาณมากกว่าตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดัน แต่ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ต่ำกว่าตัวอย่างในชุดควบคุมซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด จึงทำให้อัตราการสูญเสียน้ำหนักในชุดควบคุมมากกว่าตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดัน Ashie และคณะ (1997) รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสจะยังมีกิจกรรมอยู่ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิการแช่เย็น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของโปรตีนไมโอไฟบริล ดังนั้นจึงทำให้ตัวอย่างในทุกชุดการทดลองเกิดการสูญเสียน้ำอิสระ และทำให้ตัวอย่างเกิดการนิ่มลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา Ashie และ Simpson (1996) ได้ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากปลา bluefish (*Pomatomus saltatrix*) และปลา sheephead ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ภายหลังจากให้ความดัน 3000 atm (303.98 เมกกะปาสคาล) นาน 30 นาที พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน และทริปซินของปลา sheephead จะเพิ่มขึ้นร้อยละ 60 และ 40 ตามลำดับ ภายหลังจากเก็บรักษาที่ 21 วัน ส่วนปลา bluefish กิจกรรมของเอนไซม์คาเธปซิน C และทริปซินจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 40 และ 45 ตามลำดับ ภายหลังจากเก็บรักษาที่ 21 วัน



ภาพที่ 16 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) ต่อค่าการสูญเสียน้ำหนักของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

The effect of high pressure (200-800 MPa, 20 min) on drip loss of black tiger shrimp muscle during storage at 4 °C.

3.4 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.4.1 คุณลักษณะเนื้อสัมผัส

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธี Multisample difference test ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 8 คน ทำการทดสอบคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของกุ้งกุลาดำโดยการสัมผัสด้วยมือ พบว่า ตัวอย่างที่ได้รับความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม แสดงดังตารางที่ 9 อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างในชุดการทดลองที่ให้ความดันที่ระดับ 400 600 และ 800 เมกกะปาสคาล มีคุณลักษณะเนื้อสัมผัสที่แข็งขึ้น ($p \geq 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา นอกจากนี้ระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของกุ้งกุลาดำ โดยตัวอย่างในทุกชุดการทดลองที่ทำการเก็บรักษานาน 0 และ 3 วัน มีลักษณะแข็งกว่าตัวอย่างที่เก็บรักษานาน 12 และ 15 วัน ($p<0.05$) ตัวอย่างในทุกชุดการทดลองจะมีลักษณะนิ่มลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างในชุดควบคุมจะนิ่มลงมากหลังจากการเก็บรักษานาน 15 วัน ($p<0.05$) การนิ่มลงของตัวอย่างในระหว่างการเก็บรักษา อาจเกิดจากเอนไซม์โปรติเอสจากกล้ามเนื้อย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริล (Sato *et. al.*, 1991 อ้างโดย Hurtado *et. al.*, 2001) Ashie และคณะ (1997) รายงานว่าการสูญเสียความแน่นเนื้อของปลา bluefish ที่ผ่านการให้ความดันมีความสัมพันธ์กับการ

กลับมามีกิจกรรมอีกครั้ง (reactivation) ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษา แสดงให้เห็นว่าการนิ่มลงของเนื้อปลามีความเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในระหว่างการเก็บรักษา จากผลการทดลองในการวัดกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง พบว่าตัวอย่างในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่หลงเหลือในกล้ามเนื้อน้อยกว่าในชุดควบคุม (ดังภาพที่ 10) จึงทำให้ตัวอย่างในชุดควบคุมมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่นิ่มกว่า สุทธวัฒน์ เบญจกุล (2544) รายงานว่าการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อรวมทั้งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์โปรตีเนสต่าง ๆ มีผลในการย่อยสลายโมเลกุลโปรตีน ทำให้โครงสร้างมีลักษณะหลวมและเกิดการอ่อนตัว นอกจากนี้เอนไซม์คอลลาจีเนสมีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนตัวของกล้ามเนื้อสัตว์น้ำ โดยมีผลต่อการแยกของชิ้นเนื้อ (gaping) การอ่อนตัวของกล้ามเนื้อกุ้งมีสาเหตุจากคอลลาจีเนสจากตับอ่อน ส่งผลให้อายุการเก็บรักษาสั้นลง

ตารางที่ 9 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) ต่อคะแนนด้านคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อกุ้งกุลาดำ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

The effect of high pressure (200-800 MPa, 20 min) on texture score of black tiger shrimp muscle during storage at 4 °C.

Pressure	Texture scores					
(MPa)	0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
0.1	8.500 ^{a}	8.494 ^{a}	8.375 ^{a}	8.050 ^{a}	6.556 ^{b}	4.875 ^{c}
200	9.088 ^{a}	8.362 ^{ab}	8.238 ^{ab}	7.750 ^{b}	6.731 ^{c}	6.600 ^{c}
400	11.863 ^{a}	11.063 ^{a}	11.069 ^{a}	10.025 ^{b}	9.569 ^{b}	9.406 ^{b}
600	11.188 ^{a}	10.794 ^{a}	10.306 ^{ab}	10.988 ^{a}	9.569 ^{bc}	9.244 ^{c}
800	11.750 ^{a}	11.731 ^{a}	11.563 ^{a}	11.281 ^{a}	10.106 ^{b}	9.994 ^{b}

Values with the same superscripts in the same row indicate the significant differences of means ($p<0.05$).

3.4.2 **กลิ่นผิดปกติ** (off-odors)

คะแนนด้านกลิ่นผิดปกติของตัวอย่างกุ้งกุลาดำในทุกชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แสดงดังตารางที่ 10 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างชุดควบคุมพบว่า คะแนนด้านกลิ่นผิดปกติเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายหลังการเก็บรักษานาน 9 วัน การเพิ่มขึ้นของกลิ่นผิดปกติในระหว่างการเก็บรักษามีสาเหตุจากจุลินทรีย์พวกที่สร้างกลิ่นผิดปกติ และกลิ่นรสผิดปกติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ โดยสามารถผลิตสารระเหยมากมายหลายชนิด เช่น TMA สารประกอบซัลเฟอร์ อัลดีไฮด์ คีโตน เอสเทอร์ ไฮโปแซนทีน และสารประกอบที่มีโมเลกุลต่ำอื่นๆ จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสีย ได้แก่ *Pseudomonas, Staphylococcus, Vibrionaceae, Enterobacteriacea* และ Lactic acid bacteria จุลินทรีย์ในกุ้งที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส คือ *Pseudomonas, Moraxella* และ *Acinetobacter* และระหว่างการเน่าเสียจะเกิดสารอินโดลซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเน่าเสีย (Gram and Huss,1996 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2544) Rhee และคณะ (1997) รายงานว่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ส่งเสริมให้เกิดกลิ่นผิดปกติในเนื้อวัว โดยเชื้อ *Pseudomonas* ทำให้เกิดกลิ่นที่มีลักษณะ "หวานและเหม็นเน่า (sweet, putrid)" (Acuff *et. al.*, 1984 อ้างโดย Rhee *et. al.*, 1997) "กลิ่นหวานและเน่าเปื่อย (sweet-rotten)" (Sutherland *et. al.*, 1975 อ้างโดย Rhee *et. al.*, 1997) "กลิ่นคล้ายผลไม้ (fruity)" (Dainty *et. al.*, 1987 อ้างโดย Rhee *et. al.*, 1997) นอกจากนี้เชื้อ *Pseudomonas* ยังสามารถผลิตสารประกอบซัลเฟอร์ที่ระเหยได้ ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นเน่าในเนื้อวัวที่เก็บในสภาวะที่มีอากาศ และเชื้อ *Moraxella* สามารถสร้างสารที่ระเหยได้ที่มีลักษณะคล้ายกลิ่นผักเน่า (decayed vegetable) (Stutz *et. al.*, 1991 อ้างโดย Rhee *et. al.*, 1997) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ยังสามารถทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่า TVB-N และ TMA-N ของผลิตภัณฑ์ Hurtado และคณะ (2001) พบว่าค่า TVB-N ของเนื้อปลาหมึกสายที่ไม่ได้ผ่านการให้ความดันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 80 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่างภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 19 วัน ในขณะที่ค่า TVB-N ในตัวอย่างเนื้อปลาหมึกสายที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา นอกจากนี้ในตัวอย่างกุ้งก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยค่า TVB-N ของตัวอย่างในชุดการทดลองที่ไม่ได้ผ่านการให้ความดันมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันมีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (López-Caballera *et. al.*, 2000 อ้างโดย Hurtado *et. al.*, 2001) เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองในส่วนของการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic counts) (ตารางที่ 7) พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันมีปริมาณต่ำกว่าในชุดควบคุม ดังนั้นจึงทำให้ตัวอย่างในชุดควบคุมมี

อัตราการเกิดกลิ่นผิดปกติรวดเร็วกว่าตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาจาก 12 วัน เป็น 15 วัน

นอกจากนี้ความดันยังมีผลต่อการเร่งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนกลิ่นรส ดังจะเห็นได้จากค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (ภาพที่ 14) อีกทั้งความดันมีผลต่ออัตราการสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ การให้ความดันที่ระดับ 350 หรือ 500 เมกกะปาสคาลแก่ปลาคาฟ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถลดการเกิด IMP ได้ (Shoji and Saeki, 1989 อ้างโดย Ohshima *et. al.*, 1993) เนื่องจากความดันทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของ ATP เกิดการเสียสภาพและไม่เร่งการสลายตัวในระหว่างการให้ความดัน (Ohshima *et. al.*, 1993) Fatima และคณะ (1981) พบว่า IMP และ Hx มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของเนื้อสัตว์ แม้ว่าความดันทำให้ลดการเกิด IMP แต่ความดันทำให้ระดับของการเกิดรส umami เพิ่มขึ้น เนื่องจากความดันยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของ IMP (Ohshima *et. al.*, 1993) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันเกิดการสลายตัวเองได้ช้ากว่าตัวอย่างในชุดควบคุมซึ่งการสลายตัวดำเนินไปอย่างปกติ

ตารางที่ 10 ผลของความดันสูง (200-800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) ต่อคะแนนด้านกลิ่นผิดปกติของเนื้อกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

The effect of high pressure (200-800 MPa, 20 min) on off-odor of black tiger shrimp muscle during storage at 4 °C.

Pressure	Off-odor scores					
(MPa)	0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
0.1	0.238 ^{c}	0.288 ^{c}	1.125 ^{c}	1.506 ^{c}	4.831 ^{b}	13.437 ^{a}
200	0.125 ^{d}	2.056 ^{c}	2.206 ^{c}	2.219 ^{c}	4.394 ^{b}	5.981 ^{a}
400	0.488 ^{c}	1.169 ^{c}	2.631 ^{b}	3.419 ^{ab}	3.925 ^{ab}	4.031 ^{a}
600	1.369 ^{c}	1.563 ^{bc}	2.694 ^{abc}	2.706 ^{abc}	2.744 ^{ab}	3.375 ^{a}
800	0.513 ^{b}	3.144 ^{a}	3.219 ^{a}	3.388 ^{a}	3.444 ^{a}	3.656 ^{a}

Values with the same superscripts in the same row indicate the significant differences of means ($p<0.05$).

3.5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ

ผลของความดันต่อลักษณะปรากฏของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 0 3 6 9 12 และ 15 วัน แสดงดังภาพที่ 17-22 ตามลำดับ

3.5.1 ความขุ่น

ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันจะมีลักษณะปรากฏที่แตกต่างจากตัวอย่างในชุดควบคุม โดยตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล (ภาพที่ 17B) มีลักษณะขุ่นทึบแสงมากกว่าตัวอย่างในชุดควบคุม และความดันทำให้เนื้อกุ้งมีลักษณะขุ่นทึบแสงคล้ายกับกุ้งที่ผ่านการให้ความร้อนมากขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน (ภาพที่ 17B-17E) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Angsupanich และ Ledward (1998) ซึ่งพบว่า ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล ทำให้เนื้อปลาคอดมีลักษณะขุ่นทึบแสงและคล้ายกับเนื้อปลาที่ผ่านการให้ความร้อนมากขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน ความขุ่นของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน แต่กุ้งกุลาดำในชุดควบคุมจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยทั่วไปตัวอย่างในชุดควบคุม (ภาพที่ 17A) จะมีลักษณะใส ผิวแววาว แต่เมื่อทำการเก็บรักษากุ้งจะมีลักษณะขุ่นขึ้น สูญเสียความแววาวมากขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา (ภาพที่ 21A)

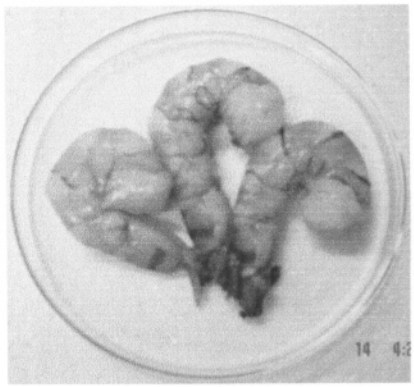
3.5.2 สี

กุ้งกุลาดำโดยทั่วไปจะมีสีเทาดำ เนื้อกุ้งมีสีใส (ภาพที่ 17A) แต่เมื่อให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล สีของแถบบนตัวกุ้งจะมีสีเทา ส่วนเนื้อกุ้งจะมีสีขาวและจะมีสีขาวเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน (ภาพที่ 17B-17E) แต่เมื่อทำการเก็บรักษากุ้งกุลาดำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าลักษณะปรากฏของตัวอย่างทุกชุดการทดลองเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดยกเว้นตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 200 400 และ 600 เมกกะปาสคาล (ภาพที่ 18B 18C และ 18D ตามลำดับ) มีสีเทาแต่จะมีสีน้ำเงินเล็กน้อยเกิดขึ้นบริเวณแถบบนตัวกุ้งภายหลังจากการเก็บรักษา 3 วัน เมื่อเก็บรักษานาน 6 วัน ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 400 และ 600 เมกกะปาสคาล (ภาพที่ 19C และ 19D ตามลำดับ) มีสีน้ำเงินกระจายทั่วไป ส่วนตัวอย่างที่ให้ความดันระดับ 200 เมกกะปาสคาล (ภาพที่ 19B) มีสีน้ำเงินกระจายทั่วไปและเริ่มปรากฏสีส้มบริเวณแถบบนตัวกุ้ง เมื่อเก็บรักษานาน 9 วัน ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 400 และ 600 เมกกะปาสคาล (ภาพที่ 20C และ 20D ตามลำดับ) มีสีน้ำเงินกระจายทั่วไปเริ่มมีสีส้มปรากฏบริเวณ

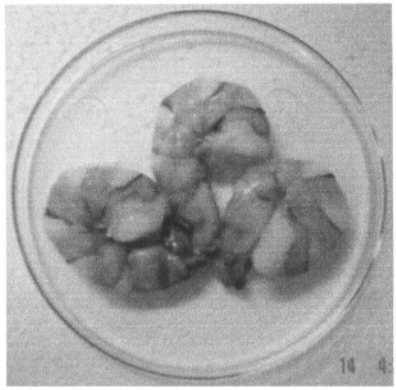
แถบบนตัวกุ้ง โดยสีน้ำเงินและสีส้มจะเข้มขึ้นและมีบริเวณกว้างขึ้นเมื่อเก็บรักษานาน 15 วัน (ภาพที่ 22C และ 22D ตามลำดับ) ในขณะที่ตัวอย่างที่ให้ความดันระดับ 200 เมกกะปาสคาล (ภาพที่ 20B) มีสีน้ำเงินเล็กน้อยแต่มีสีส้มบริเวณกว้างขึ้นเมื่อเก็บรักษานาน 15 วัน (ภาพที่ 22B) ส่วนตัวอย่างในชุดควบคุมจะมีสีคล้ำดำมากขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา และจะเริ่มปรากฏสีส้มภายหลังการเก็บรักษานาน 12 วัน (ภาพที่ 21A)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏของกุ้งที่ผ่านการให้ความดันมักเกิดสีน้ำเงินขึ้นบนตัวกุ้ง ทั้งนี้อาจเกิดจากโปรตีนฮีโมไซยานิน ที่พบทั่วไปในสัตว์พวกครัสตาเซีย ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยทองแดง (Motohiro, 1982 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2544) เมื่อให้ความดันตั้งแต่ 300-400 เมกกะปาสคาล ทำให้โปรตีนไมโอไฟบริล และโปรตีนซาร์โคพลาสมิกเกิดการเสียสภาพ ทำให้เกิดการปลดปล่อยไอออนของโลหะ (Fe และ Cu) จากโครงสร้างเชิงซ้อนของโปรตีนโดยที่ความดันระดับสูงทำให้เกิดการปลดปล่อยไอออนของโลหะได้เพิ่มขึ้น (Cheah and Ledward, 1997) ไอออนของโลหะเหล่านี้จะเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและทองแดงที่เกิดขึ้นอาจทำให้เกิดสีน้ำเงินได้ เมื่อมีการสะสมของทองแดงในปริมาณสูงและทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจคล้ายคลึงกับการเกิดสีน้ำเงิน (blueing) ในเนื้อปูซึ่งเป็นสัตว์ในกลุ่ม ครัสตาเซีย (Motohiro, 1982 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2544) Chinivasagam และคณะ (1998) พบว่า เชื้อ *Shewanella putrefaciens* และ *Pseudomonas fragi* ที่พบในกุ้ง *Penacus esculentus* และ *P. semisulcatus* สามารถผลิตสารประกอบพวกซัลไฟด์ที่ระเหยได้ และสารประกอบพวกเอมีน ดังนั้นจึงสามารถทำให้เกิดสีน้ำเงินได้ในระหว่างการเก็บรักษา ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล แม้ว่าจะเกิดการเสียสภาพของโปรตีนและมีปริมาณ Cu ในปริมาณสูง (Cheah and Ledward, 1997) แต่มีปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์ในระดับต่ำ เนื่องจากความดันที่ระดับนี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้มาก จึงทำให้ไม่เกิดลักษณะสีน้ำเงิน นอกจากนี้การย่อยสลายโปรตีนอันเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างการเก็บรักษาส่งผลให้มีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น เมื่อกรดอะมิโนอิสระเหล่านี้ทำปฏิกิริยากับไอออนของ Cu ที่มีอยู่ภายในกล้ามเนื้อกุ้งจะได้สารประกอบที่มีสีน้ำเงิน (Copeland, 1994) จึงทำให้ตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีน้ำเงินเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา ส่วนการเกิดสีส้มเกิดจากในระหว่างการเก็บรักษาเอนไซม์โปรติเอสจะย่อยสลายโปรตีนที่อยู่ในโครงสร้างเชิงซ้อนของแคโรทีโนโปรตีน จึงทำให้โปรตีนไม่สามารถจับรวมตัวกับรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้ จึงทำให้มองเห็นสีของแคโรทีนอยด์ซึ่งมีสีแดงหรือสีส้มได้ชัดเจน กฤษณา โสภณพงษ์ (2538) รายงานว่าการเกิดลักษณะสีส้มจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับกุ้งที่เสื่อมเสียแล้ว ดังนั้นตัวอย่างที่ให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าที่ความดันระดับอื่น ทำให้ปรากฏลักษณะสีส้มเร็วกว่าตัวอย่างในชุดการทดลองอื่น

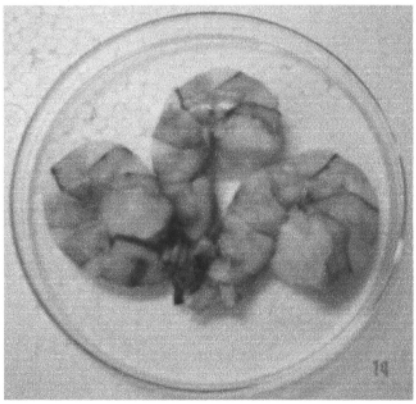
A



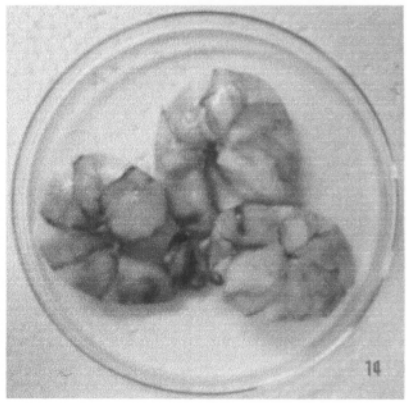
B



C



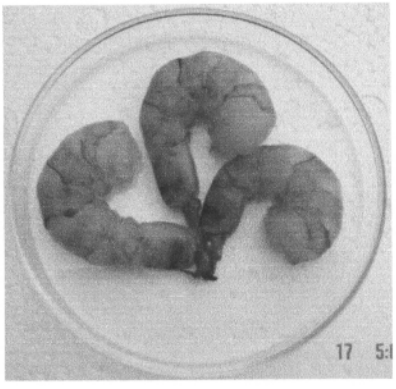
D



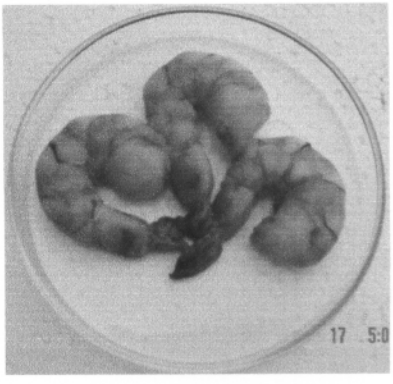
E

ภาพที่ 17 ผลของความดันสูง ({0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) และ 800 (E) เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที} ต่อลักษณะปรากฏของกุ้งกุลาดำ

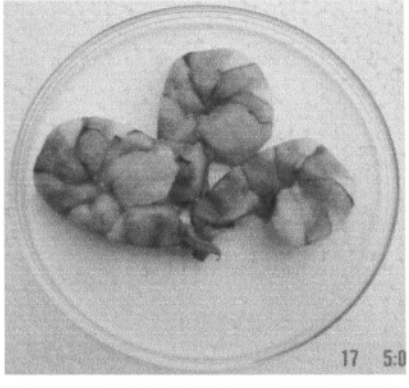
The effect of high pressure {0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) and 800 (E) MPa for 20 min} on the appearance of the black tiger shrimps.



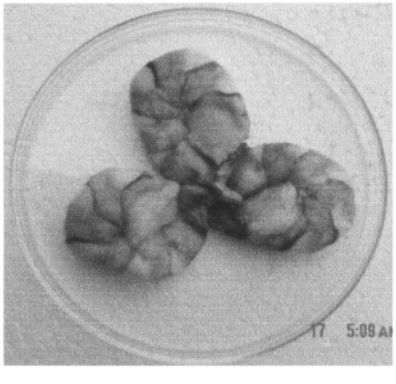
A



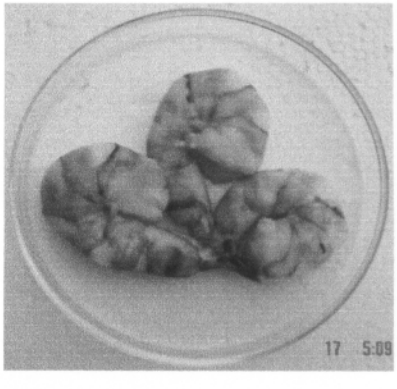
B



C



D

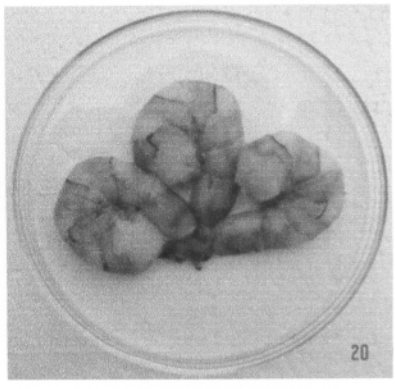


E

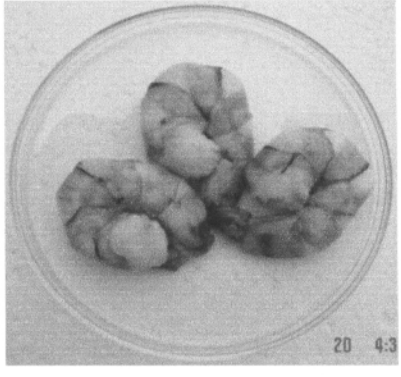
ภาพที่ 18 ผลของความดันสูง ({0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) และ 800 (E) เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที} ต่อลักษณะปรากฏของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

The effect of high pressure {0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) and 800 (E) MPa for 20 min} on the appearance of the black tiger shrimps after 3 days of storage at 4 °C.

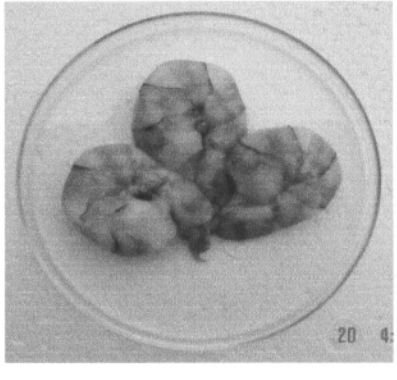
A



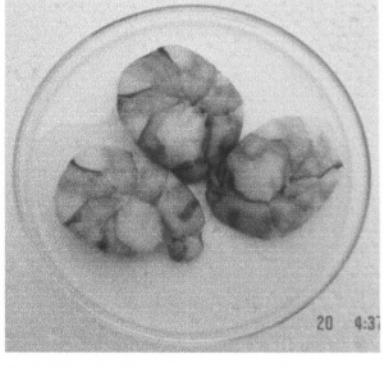
B



C



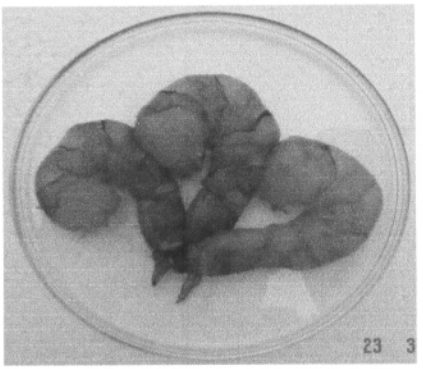
D



E

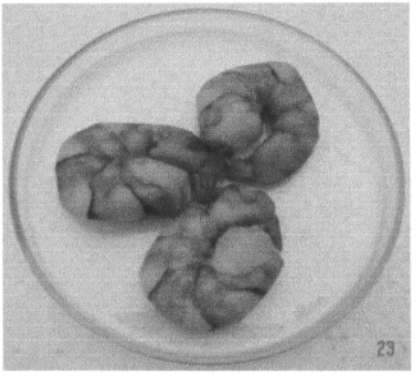
ภาพที่ 19 ผลของความดันสูง ({0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) และ 800 (E) เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที} ต่อลักษณะปรากฏของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน

The effect of high pressure {0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) and 800 (E) MPa for 20 min} on the appearance of the black tiger shrimps after 6 days of storage at 4 °C.

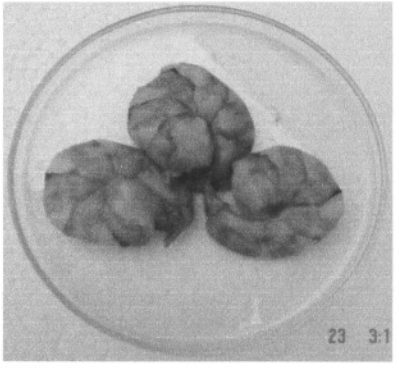


A

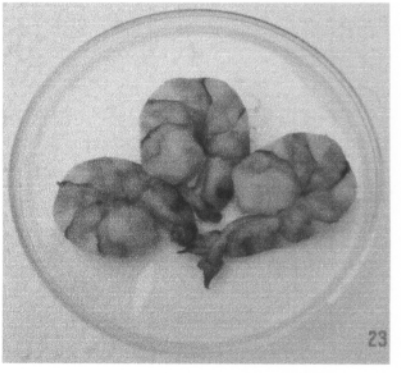
B



C



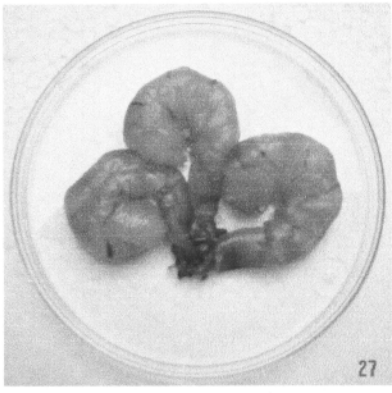
D



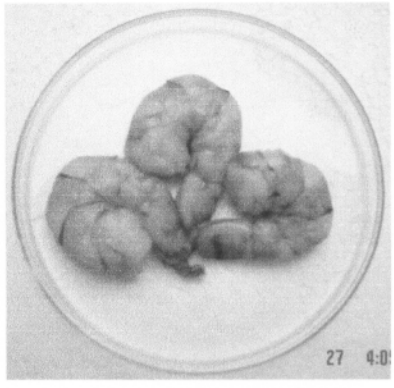
E

ภาพที่ 20 ผลของความดันสูง ({0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) และ 800 (E) เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที} ต่อลักษณะปรากฏของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 9 วัน

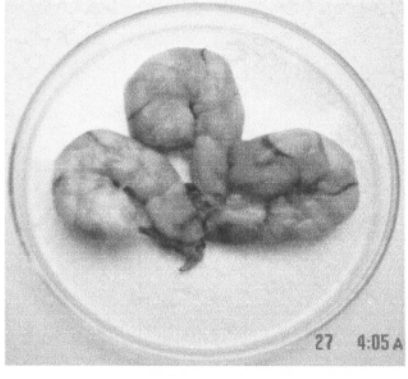
The effect of high pressure {0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) and 800 (E) MPa for 20 min} on the appearance of the black tiger shrimps after 9 days of storage at 4 °C.



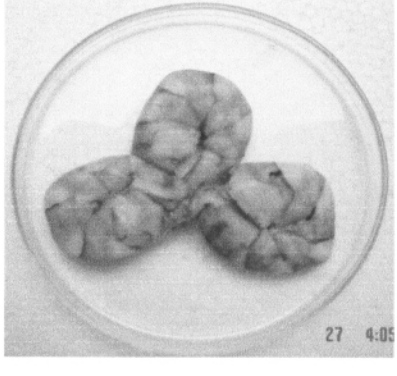
A



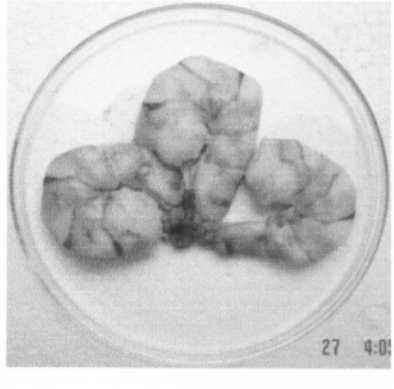
B



C



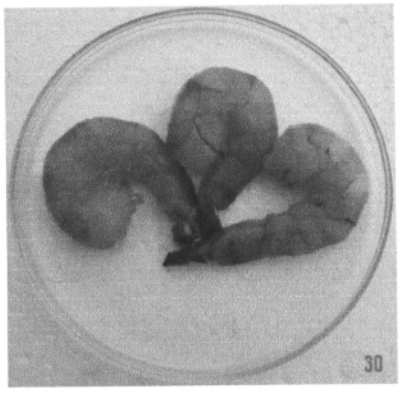
D



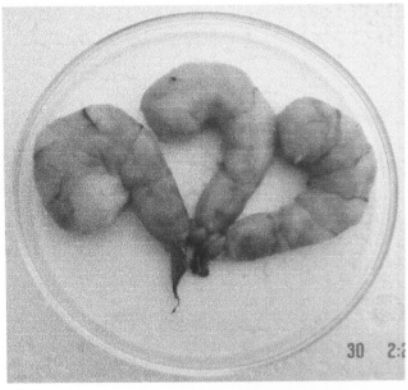
E

ภาพที่ 21 ผลของความดันสูง ({0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) และ 800 (E) เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที} ต่อลักษณะปรากฏของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน

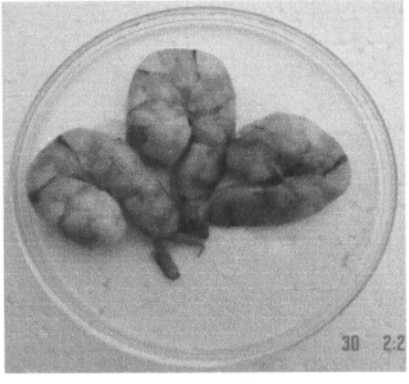
The effect of high pressure {0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) and 800 (E) MPa for 20 min} on the appearance of the black tiger shrimps after 12 days of storage at 4 °C.



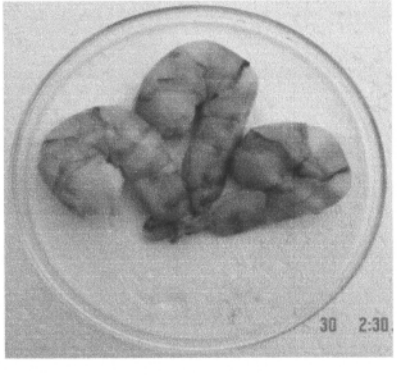
A



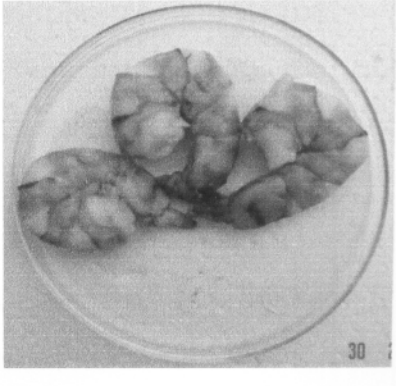
B



C



D



E

ภาพที่ 22 ผลของความดันสูง ({0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) และ 800 (E) เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที} ต่อลักษณะปรากฏของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน

The effect of high pressure {0.1 (A), 200 (B), 400 (C), 600 (D) and 800 (E) MPa for 20 min} on the appearance of the black tiger shrimps after 15 days of storage at 4 ˚C.

4. ผลของการใช้ความร้อน ความดันสูง และการใช้ความร้อนร่วมกับความดันสูงต่อการเกิดเจลของเนื้อกุ้งกุลาดำบด

การใช้ความร้อน ความดันสูง และการใช้ความร้อนร่วมกับความดันสูงมีผลต่อคุณสมบัติการเกิดเจลของเนื้อกุ้งกุลาดำบด ดังนี้

4.1 ลักษณะปรากฏ

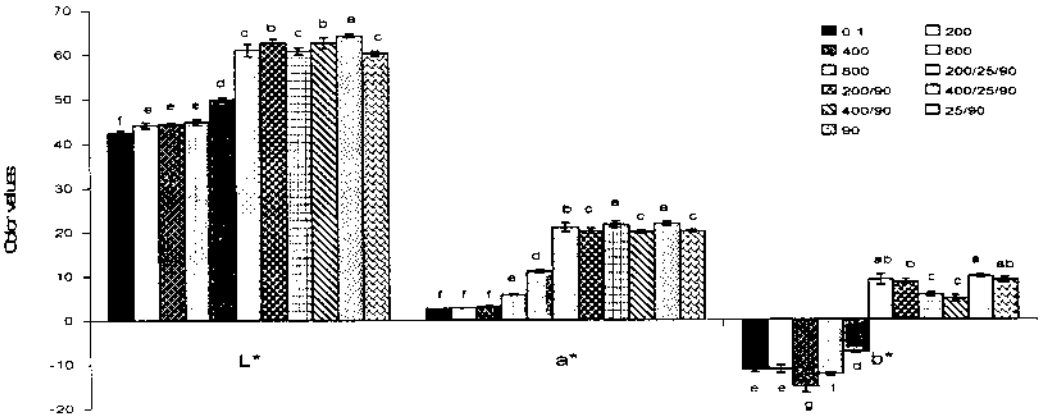
4.1.1 ความขุ่น

เนื้อกุ้งกุลาดำบดที่ให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาสจะมีลักษณะขุ่นทึบแสงเหมือนกับเนื้อกุ้งกุลาดำบดที่ไม่ผ่านการแปรรูป (ชุดควบคุม) แต่เมื่อให้ความดันตั้งแต่ 400 เมกกะปาสคาล จะทำให้เกิดเจลที่มีลักษณะโปร่งแสง (transparent) และเกิดลักษณะเงามัน (glossy) ส่วนเจลที่เตรียมด้วยการให้ความร้อนและความดันร่วมกับความร้อนจะมีลักษณะขุ่นทึบแสง และไม่มีลักษณะเงามัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chung และคณะ (1994) พบว่าเจลซูริมิที่ผลิตด้วยความดันจากปลา Alaska pollack และ Pacific whiting จะมีลักษณะโปร่งใส เป็นเงามัน ซึ่งมีลักษณะปรากฏที่แตกต่างจากเจลที่เกิดจากความร้อนที่มีลักษณะขุ่นทึบแสง Okamoto และคณะ (1990) รายงานว่าการจัดเรียงตัวของโมเลกุลของน้ำรอบกรดอะมิโนในขั้นตอนการเสียสภาพของโปรตีนด้วยความดัน ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของลักษณะเจลที่มีความมันวาวและโปร่งใส

4.1.2 สี

โดยทั่วไปเนื้อกุ้งกุลาดำบดจะมีสีเทาดำ ภายหลังจากเนื้อกุ้งกุลาดำบดได้รับความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล พบว่าเจลที่ได้มีค่า L* มากกว่าเนื้อกุ้งกุลาดำบดที่ไม่ผ่านการแปรรูป (ชุดควบคุม) ($p<0.05$) แต่มีค่า a* และ b* ไม่แตกต่างกัน ($p\geq0.05$) ดังภาพที่ 23 แต่เมื่อให้ความดันขึ้นเป็น 400 เมกกะปาสคาล เจลจะมีสีม่วงอ่อน เมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน เจลที่ได้จะมีค่า L* a* และ b* เพิ่มขึ้น โดยเจลจะมีสีแดงเพิ่มขึ้นและจะมีสีคล้ายคลึงกับสีของเจลกุ้งที่ผ่านการให้ความร้อน ความดันทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนจึงทำให้ตัวอย่างมีค่า L* เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Nagashima และคณะ (1993) โดยพบว่าเมื่อเนื้อปลาหมึกบดได้รับความดันในระดับ 200 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ค่าความสว่าง (ค่า L) ของเจลที่ได้จะเพิ่มขึ้นและมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอีกเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน นอกจากนี้ Shoji และคณะ (1990) พบว่าเจลซูริมิจากปลา Alaska pollack มีค่าความขาว (whiteness) เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน เช่นเดียวกับ Angsupanich และ Ledward (1998) พบว่าความดันทำให้เนื้อปลาคอดมีค่าความสว่างเพิ่มขึ้นและจะมีลักษณะคล้ายกับเนื้อปลาที่ผ่านการให้ความร้อนมากขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน แต่อย่างไรก็ตาม เจลกุ้งกุลาดำที่ให้ความดันเพียงอย่างเดียวและชุดควบคุมจะมีค่า L* ต่ำกว่าชุดการ

ทดลองที่มีการให้ความร้อนหรือความร้อนร่วมกับความดัน ($p<0.05$) ส่วนค่า a* และค่า b* ของเจลกุ้งกุลาดำที่ผ่านการให้ความดันมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน โดยสีของเนื้อกุ้งบดจะเปลี่ยนจากสีเทาดำเป็นสีแดงหรือสีส้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน เนื่องจากการเสียสภาพของโครงสร้างเชิงซ้อนของแอสตาแซนธินกับโปรตีนอันเนื่องมาจากความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง spectroscopic และคุณสมบัติการมองเห็นสีของรงควัตถุ ดังนั้นจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของโครงสร้างเชิงซ้อนเป็นสีแดง (Von Elbe and Schwartz, 1996) ความดันทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเช่นเดียวกับผลของความร้อน โดยที่ความดันที่ระดับต่ำ (200 เมกกะปาสคาล) ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนเล็กน้อย ขณะที่ความดันตั้งแต่ 400 เมกกะปาสคาล ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนมากขึ้นจึงทำให้สีของเจลกุ้งที่ได้มีสีม่วงอ่อนและมีสีแดงเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน แต่อย่างไรก็ตาม ค่า L* a* และค่า b* ของตัวอย่างเจลที่ให้ความดันเพียงอย่างเดียว มีค่าต่ำกว่าเจลที่มีการให้ความร้อนหรือความร้อนกับความดัน เนื่องจากเจลกุ้งที่ผ่านการให้ความร้อนเกิดการเสียสภาพอันเนื่องมาจากอุณหภูมิสูงกว่าเจลกุ้งที่ผ่านการให้ความดัน



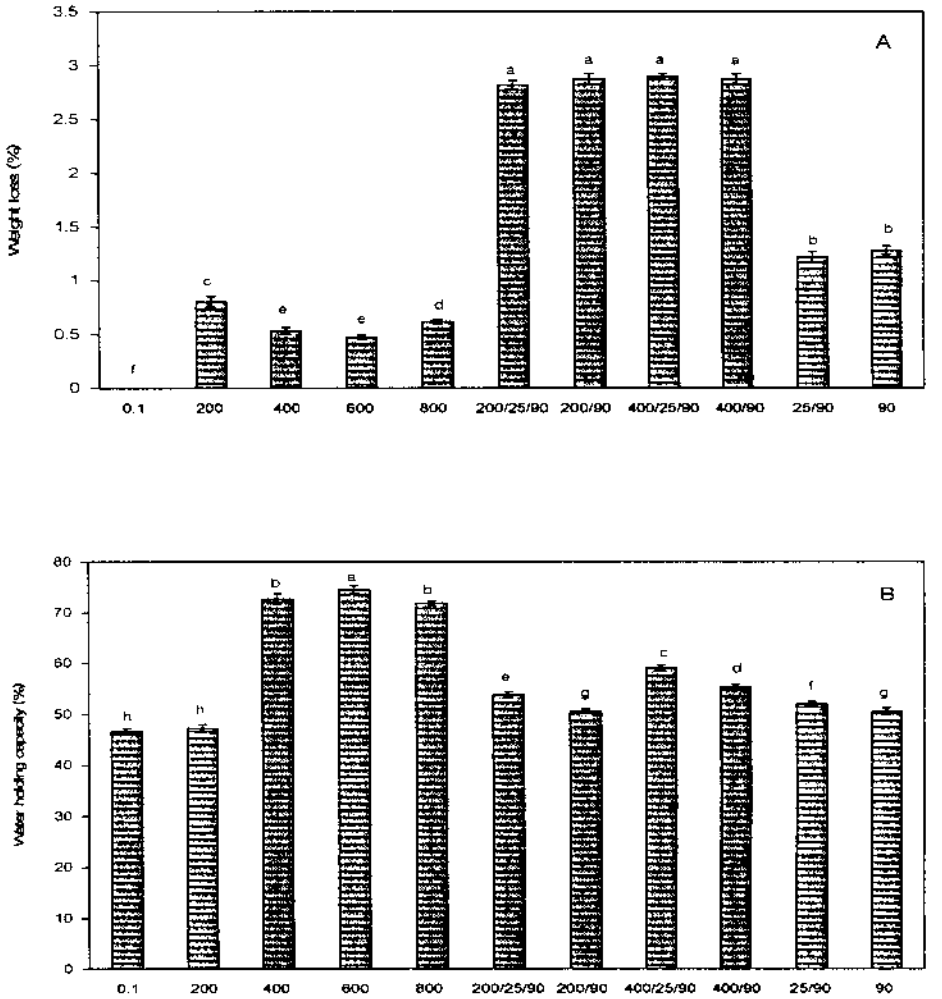
ภาพที่ 23 ค่าสี (L*, a* และ b*) ของเจลจากเนื้อกุ้งกุลาดำบดที่เตรียมโดยการใช้ความร้อน (25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง / 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที) การใช้ความดันสูง (0.1 200 400 600 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) หรือการใช้ความร้อนร่วมกับความดันสูง {(200 เมกกะปาสคาล / 25องศาเซลเซียส / 90 องศาเซลเซียส) (200 เมกกะปาสคาล / 90 องศาเซลเซียส) (400 เมกกะปาสคาล / 25 องศาเซลเซียส/90 องศาเซลเซียส) (400 เมกกะปาสคาล / 90 องศาเซลเซียส)} Color values of heat (25 °C, 2 hr / 90 °C, 20 min and 90 °C, 20 min), pressure (0.1 200 400 600 800 MPa for 20 min) or pressure-heat {(200 MPa / 25 °C / 90 °C) (200 MPa / 90 °C) (400 MPa / 25 °C / 90 °C) (400 MPa / 90 °C)} induced gels from minced black tiger shrimp. The same letters under the same color values indicate non significant differences ($p\geq0.05$). Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

4.2 ค่าการสูญเสียน้ำหนักและความสามารถในการอุ้มน้ำ

ในชุดการทดลองที่ทำให้เนื้อกุ้งกุลาดำบดเกิดเจลโดยการให้ความดัน พบว่ามีค่าการสูญเสียน้ำหนักต่ำกว่าชุดการทดลองที่ทำให้เนื้อกุ้งกุลาดำบดเกิดเจลด้วยความร้อน และให้ความดันร่วมกับความร้อน ($p<0.05$) แสดงดังภาพที่ 24A Hurtado และคณะ (2001) รายงานว่าความดันทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน จึงทำให้เกิดการสูญเสียน้ำออกจากโครงสร้างของโปรตีนภายหลังการให้ความดัน โดยการให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาลมีค่าการสูญเสียน้ำหนักต่ำที่สุด ส่วนตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลโดยการให้ความร้อนในชุดการทดลองที่มีการให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียวมีค่าการสูญเสียน้ำหนักที่ไม่แตกต่างจากกการให้ความร้อนแบบ 2 ขั้นตอน ($p\geq0.05$) แต่จะมีค่าสูงกว่าการเกิดเจลด้วยความดัน ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการจับกับน้ำ (water binding capacity) ของโปรตีนจะลดลงเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการลดลงของพันธะไฮโดรเจนและลดการจับกับน้ำของหมู่ที่มีประจุ (Damodaran, 1996) ส่งผลให้เจลที่เกิดเจลด้วยความร้อนมีค่าการสูญเสียน้ำหนักสูงกว่าเจลที่เกิดเจลด้วยความดัน อย่างไรก็ตาม ค่าการสูญเสียน้ำหนักของเจลที่ทำให้เกิดเจลโดยการให้ความดันร่วมกับความร้อนจะมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่น เนื่องจากการให้ความดันและการให้ความร้อนต่างก็ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนัก จึงเกิดการสูญเสียน้ำหนักในระหว่างการผลิตทั้งสองขั้นตอนส่งผลให้มีค่าการสูญเสียน้ำหนักสูงที่สุด โดยการให้ความดันที่ระดับต่ำทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติในระดับหนึ่ง หลังจากให้ความร้อนทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติเพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดการลดลงของพันธะไฮโดรเจน

ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลโดยการให้ความดัน มีค่าสูงกว่าตัวอย่างในชุดการทดลองอื่น ($p<0.05$) ยกเว้นตัวอย่างที่มีการให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล ซึ่งมีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ($p<0.05$) แต่มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำไม่แตกต่างกับเนื้อกุ้งกุลาดำบด (ชุดควบคุม) ($p\geq0.05$) แสดงดังภาพที่ 24B ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ไม่สามารถทำให้เกิดเจลกุ้งกุลาดำได้ จึงมีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำไม่แตกต่างจากเนื้อกุ้งกุลาดำบด อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน ทำให้เกิดเจลที่มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำสูงขึ้น และเมื่อให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที จะมีค่าลดลง เนื่องจากความดันทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนไมโอไฟบริล ทำให้เกิดการเปิดออกของโครงสร้างโปรตีน และเกิดการโผล่ตำแหน่งของหมู่ที่สามารถสร้างพันธะ (binding site) ความดันทำให้เกิดการสร้างแรงกระทำระหว่างโปรตีนในระหว่างการให้ความดันและระหว่างการลดความดัน (Gilleland *et al.*, 1997) ดังนั้นการให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาล จึงทำให้เกิดการสร้างแรงกระทำระหว่างโปรตีนได้มากกว่าการให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล ส่งผลให้สามารถเก็บกักน้ำในโครงสร้างของโปรตีนได้มากกว่า แต่การให้ความ

ดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล ทำให้เกิดการสูญเสียสภาพของโปรตีนอย่างรวดเร็วกว่าสภาวะที่ให้ความดันต่ำกว่าทำให้เกิดการรวมกลุ่มของโปรตีนและเกิดการสูญเสียน้ำออกโครงข่ายเจลได้มากกว่า จึงทำให้มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำกว่าการให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาล ซึ่งอาจจะคล้ายคลึงกับผลของความร้อนโดย Niwa (1992 อ้างโดย Benjakul *et al.*, 2002) รายงานว่าการให้ความร้อนโดยตรงเป็นการทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว โดยทำให้โปรตีนเกิดการคลายเกลียวและตกตะกอนอย่างรวดเร็ว จึงทำให้การกระจายตัวของโครงข่ายโปรตีนไม่มีความสม่ำเสมอ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำออกจากโครงสร้าง นอกจากนี้การให้ความดันสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสได้บางส่วน จึงทำให้ลดการขาดของเส้นใยโปรตีน เจลจึงสามารถกักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้างของเจลได้มาก ส่วนตัวอย่างที่มีการให้ความดันร่วมกับความร้อน พบว่าการให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล ร่วมกับการให้ความร้อนมีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำสูงกว่าการให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล ร่วมกับการให้ความร้อน ($p<0.05$) เนื่องจากการให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาลเป็นระดับความดันที่มากพอที่จะทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ และสร้างโครงข่ายสามมิติของเส้นใยโปรตีนที่เป็นระเบียบมากกว่า แต่เมื่อให้ความร้อนทำให้เกิดการเร่งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ ซึ่งมีอุณหภูมิสูงสุดอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส การให้ความร้อนทำให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 55-70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานานประมาณ 10 นาที (ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 4) จากการย่อยสลายโปรตีนทำให้เกิดการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีส่วนสำคัญกับการสร้างแรงกระทำระหว่างโมเลกุลจึงทำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างของเจล (Visessanguan and An, 2000) นอกจากนี้ความดันสามารถทำให้เกิดการสร้างแรงกระทำกับน้ำผูกพัน (bound water) ด้วยพันธะไฮโดรเจน จึงทำให้สามารถกักเก็บน้ำผูกพันไว้ในโครงสร้างของโปรตีนได้ แต่ภายหลังจากการให้ความร้อนทำให้เกิดการทำลายพันธะไฮโดรเจนจึงทำให้เกิดการสูญเสียน้ำอิสระและอาจสูญเสียน้ำผูกพัน จึงกักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้างของโปรตีนได้น้อยกว่า อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่มีการให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล ร่วมกับการให้ความร้อนมีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำมากกว่าตัวอย่างที่ให้ความร้อน ($p<0.05$) แม้ว่าจะมีค่าการสูญเสียน้ำหนักมากกว่าก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล ร่วมกับการให้ความร้อนมีการสูญเสียน้ำมาก จึงทำให้มีปริมาณน้ำที่หลงเหลือในตัวอย่างในปริมาณน้อย ทำให้ปริมาณน้ำที่ออกมาภายหลังการหมุนเหวี่ยงน้อย โดยค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของตัวอย่างคำนวณมาจากสัดส่วนของปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ในตัวอย่างต่อปริมาณความชื้นในตัวอย่างเริ่มต้น (Jathupong *et al.*, 2000)



ภาพที่ 24 การสูญเสียน้ำหนัก (A) และค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (B) ของเจลจากเนื้อกุ้งกุลาดำบดที่เตรียมโดยการใช้ความร้อน (25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง / 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที) การใช้ความดันสูง (0.1 200 400 600 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) หรือการใช้ความร้อนร่วมกับความดันสูง {(200 เมกกะปาสคาล / 25องศาเซลเซียส / 90 องศาเซลเซียส) (200 เมกกะปาสคาล / 90 องศาเซลเซียส) (400 เมกกะปาสคาล / 25 องศาเซลเซียส/90 องศาเซลเซียส) (400 เมกกะปาสคาล / 90 องศาเซลเซียส)}

Weight loss (A) and water holding capacity (B) of heat (25 °C, 2 hr / 90 °C, 20 min and 90 °C, 20 min), pressure (0.1 200 400 600 800 MPa for 20 min) or pressure-heat {(200 MPa / 25 °C / 90 °C) (200 MPa / 90 °C) (400 MPa / 25 °C / 90 °C) (400 MPa / 90 °C)} induced gels from minced black tiger shrimp.

The same letters indicate non significant differences ($p \geq 0.05$).

Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

4.2 **ค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุ** (breaking force and deformation)

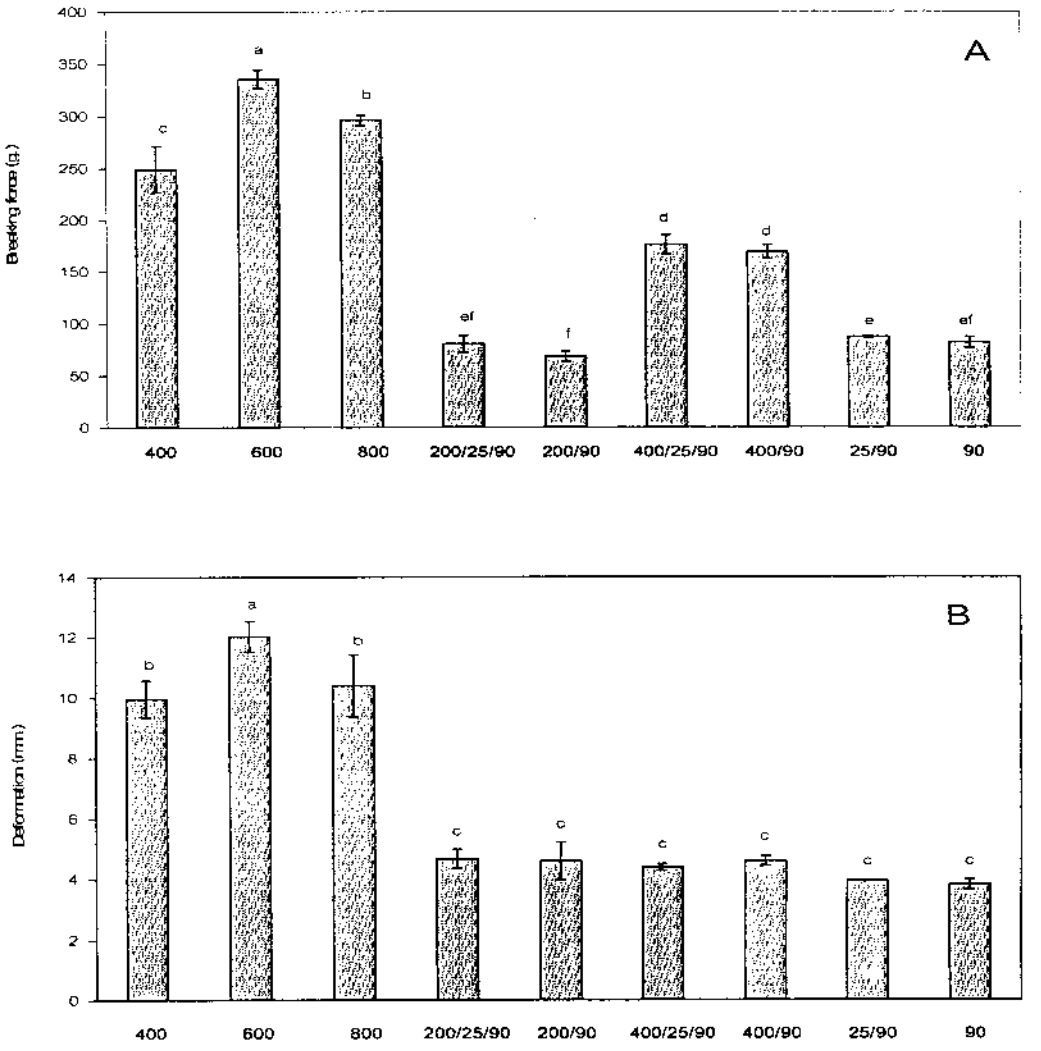
การให้ความดันตั้งแต่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที สามารถทำให้เนื้อกุ้งกุลาดำบดเกิดเจลได้ ค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลกุ้งกุลาดำที่เกิดเจลโดยการใช้ความดันมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดันจนถึง 600 เมกกะปาสคาล และเมื่อให้ความดันเพิ่มขึ้นเป็น 800 เมกกะปาสคาล ค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลกุ้งกุลาดำจะมีค่าลดลง ดังภาพที่ 25 การเกิดเจลด้วยความดันเกิดจากความดันทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนไมโอไฟบริล ทำให้เกิดการเปิดออกของโครงสร้างโปรตีน และเกิดการโผล่ตำแหน่งของหมู่ที่สามารถสร้างพันธะ (binding site) ความดันทำให้เกิดการสร้างแรงกระทำระหว่างโปรตีนในระหว่างการให้ความดันและระหว่างการลดความดัน (Gilleland *et al.*, 1997) เมื่อให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล มีผลทำให้เจลมีค่าการสูญเสียน้ำออกมากทำให้ความแข็งแรงของเจลลดลง (ภาพที่ 24A) โดย Benjakul และคณะ (2002) รายงานว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณของเหลวบีบอัด (expressible drip) มีความสัมพันธ์กับการลดลงของค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength) นอกจากนี้ค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลกุ้งกุลาดำที่เกิดเจลด้วยความดันในทุกชุดการทดลองมีค่าสูงกว่าเจลกุ้งที่เกิดเจลด้วยความร้อน ($p<0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เจลกุ้งที่เกิดเจลด้วยความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาลมีค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุสูงกว่า เจลกุ้งกุลาดำที่เกิดเจลด้วยความร้อน ($p<0.05$) ประมาณ 4 และ 3 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเกิดเจลด้วยความดันทำให้เจลมีความแข็งแรง และมีความยืดหยุ่นมากกว่าเจลกุ้งที่เกิดเจลด้วยความร้อน

ค่าแรงก่อนเจาะทะลุของเจลกุ้งกุลาดำที่ทำให้เกิดเจลโดยการใช้ความดันร่วมกับความร้อนมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดัน ($p<0.05$) แต่ระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลกุ้งในทุกชุดการทดลองที่ทำให้เกิดเจลโดยการใช้ความร้อนร่วมด้วยมีค่าไม่แตกต่างกัน ($p\geq0.05$) นอกจากนี้ค่าแรงก่อนเจาะทะลุของเจลกุ้งที่เกิดเจลโดยการใช้ความดันระดับ 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที มีค่าสูงกว่าตัวอย่างในชุดการทดลองที่ใช้ความร้อนในการเกิดเจลโดยไม่มีการใช้ความดัน เจลกุ้งกุลาดำที่เกิดเจลโดยการใช้ความดันร่วมกับการให้ความร้อนในทุกชุดการทดลองมีค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุต่ำกว่าเจลกุ้งกุลาดำที่เกิดเจลโดยการใช้ความดันเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเกิดจากการให้ความร้อนภายหลังจากการให้ความดัน อาจทำให้เกิดการทำลายแรงกระทำระหว่างโปรตีนอันเนื่องมาจากความร้อนได้ จาก DSC เทอร์โมแกรม (ภาพที่ 11) พบว่าการให้ความดันทำให้เกิด Peak N ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นของโครงข่ายของพันธะไฮโดรเจน ซึ่งมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนไมโอซินตามธรรมชาติ เนื่องจากการให้ความดันทำให้เกิดการสลายแรงกระทำระหว่างประจุและพันธะไฮโดรโฟบิก รวมทั้งทำให้เกิดการแตกออกของพันธะไฮโดรเจน แต่อย่างไรก็ตามภายหลังจากการปลดปล่อยความดันพันธะไฮโดรเจนจะถูกสร้างขึ้น แรงกระทำระหว่างประจุและพันธะ

ไฮโดรโฟบิกอาจถูกสร้างขึ้นภายหลังจึงทำให้โครงสร้างหลักที่เกิดขึ้นภายหลังจากการให้ความดันจึงเป็นโครงข่ายของพันธะไฮโดรเจน (Angsupanich and Ledward, 1998) นอกจากนี้ Cheftel (1992 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2543) และ Shoji และคณะ (1990) รายงานว่าในการเกิดเจลโปรตีนจากปลาด้วยความดันสูงนั้น พบว่าพันธะไฮโดรโฟบิก พันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์หรือพันธะไดซัลไฟด์ มีบทบาทสำคัญในการเกิดเจล Berg และคณะ (1965 อ้างโดย Gilleland *et al.*, 1997) พบว่าปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลอิสระของไมโอซินเพิ่มขึ้นเมื่อให้ความดันสูงเพิ่มขึ้นเป็น 300 เมกกะปาสคาล ทำให้พันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดเจลด้วยความดัน ดังนั้นการให้ความร้อนภายหลังจากการให้ความดัน อาจเกิดการทำลายแรงกระทำระหว่างโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นโดยความดัน จึงทำให้ค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลกุ้งที่เกิดเจลโดยการใช้ความดันร่วมกับความร้อน มีค่าต่ำกว่าการให้ความดันเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้การให้ความร้อนอาจทำให้เกิดการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ภาพประกอบภาคผนวกที่ 1) Chung และคณะ (1994) รายงานว่าสภาวะการให้ความดันและอุณหภูมิมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในเจลของปลา Pacific Whiting และ Alaska pollack เพิ่มขึ้น เช่น การให้ความดัน 170 กิโลปาสคาล / 50 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสทำงานได้ดี (Motsumoto and Noguchi, 1992 อ้างโดย Chung *et al.*,1994) ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริล ทำให้เจลอ่อนตัวที่อุณหภูมินั้น (Chung *et al.*,1994) Ishioroshi และคณะ (1982 อ้างโดย Visessanguan and An, 2000) รายงานว่า คุณสมบัติของเจลของไมโอซินมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความยาวส่วนหางของไมโอซิน (double-stranded α-helical tail) การย่อยสลายไมโอซินเกิดเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง และทำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างแรงกระทำและการจับกันของโมเลกุล ดังนั้นการย่อยสลายหรือทำลายโปรตีนไมโอไฟบริลโดยเอนไซม์โปรติเนส จะมีผลยับยั้งการเกิดโครงข่ายสามมิติของเจลในระหว่างการให้ความร้อน (Visessanguan *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามได้ทำการตรวจสอบผลของเอนไซม์โปรติเอสต่อค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจล โดยการเติมโปรตีนพลาสมาเลือดวัว (Beef plasma protein, BPP) ร้อยละ 3 เป็นสารยับยั้งการย่อยสลายของเอนไซม์โปรติเอสลงในเจลกุ้งกุลาดำแล้วทำการให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียว คือให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ การให้ความร้อนแบบ 2 ขั้นตอน คือ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่เติม BPP พบว่า ค่าแรงและระยะทางก่อนการเจาะทะลุของเจลกุ้งที่มีการเติม BPP ร้อยละ 3 มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการเติม ($p<0.05$) (ดังภาพที่ 26) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริล

ส่งผลให้การจัดเรียงตัวของโปรตีนในการเกิดเจล ลดลง ดังนั้นรูปแบบธรรมชาติของไมโอซินจึงมีความจำเป็นต่อการเกิดเจล (Visessanguan and An, 2000) ซึ่งการเกิดเจลด้วยความร้อนจะให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเกิดเจลจะต้องผ่านอุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสในกุ้ง ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดคือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส การให้ความร้อนทำให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 55-70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานานประมาณ 10 นาที (ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 4) นอกจากนี้การบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อาจเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสสามารถมีกิจกรรมจึงอาจส่งผลให้เกิดการอ่อนตัวของเจล

ในชุดการทดลองที่มีการให้ความร้อนแบบ 2 ขั้นตอน คือ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และการใช้ความดันร่วมกับความร้อนแบบ 2 ขั้นตอน เจลกุ้งกุลาดำที่ได้จะมีค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุไม่มีความแตกต่างกับตัวอย่างในชุดการทดลองที่มีการให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียวและการให้ความดันร่วมกับความร้อนแบบขั้นตอนเดียว คือให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ($p \geq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อความแข็งแรงของเจล ซึ่งอาจเนื่องมาจากในกุ้งกุลาดำมีเอนไซม์ endogenous transglutaminase ในระดับต่ำจึงไม่สามารถสร้างพันธะ ε-(γ-glutamyl) lysine ได้จึงทำให้เจลที่เกิดเจลด้วยความร้อนทั้งสองแบบมีค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุไม่มีความแตกต่างกัน

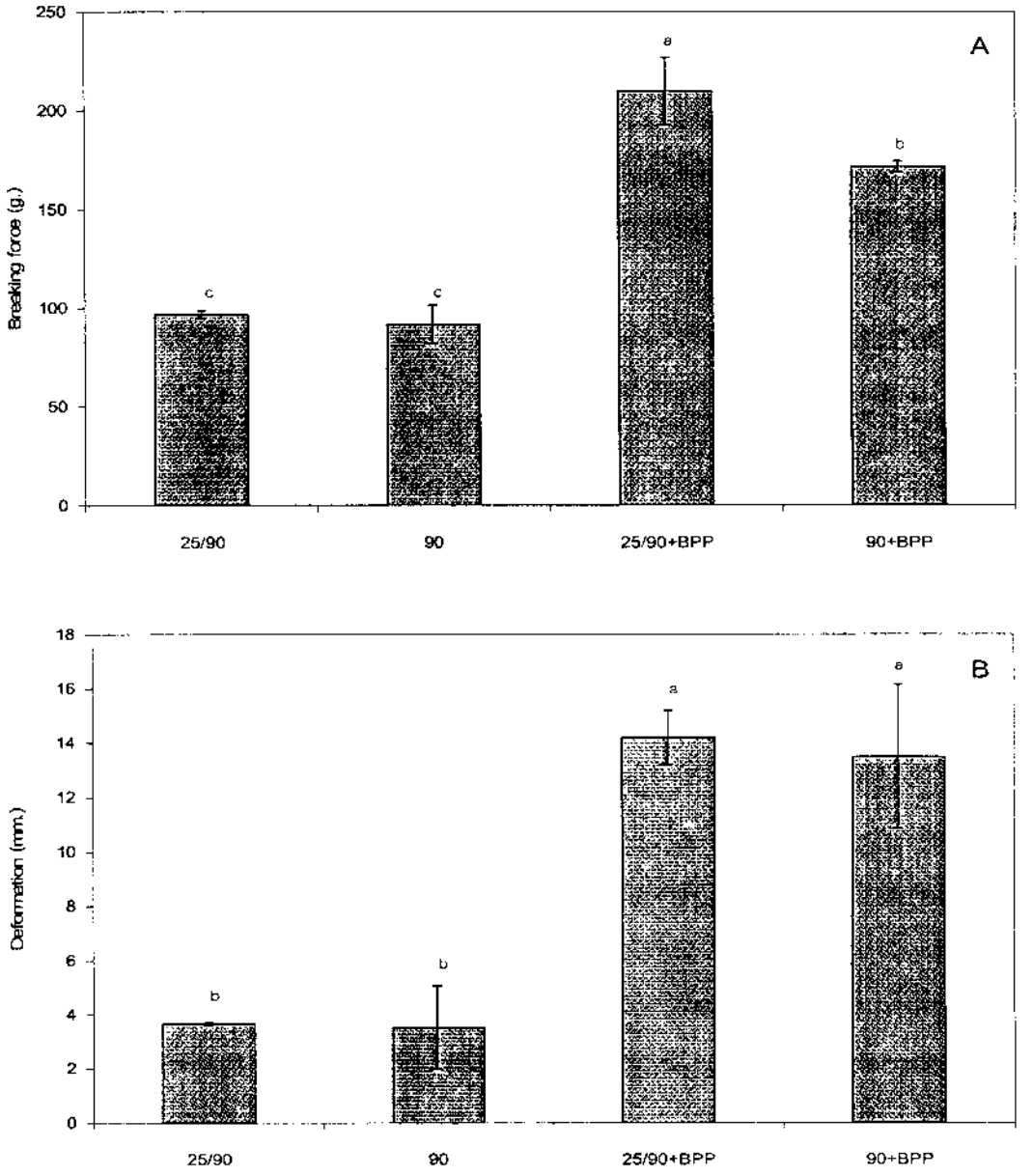


ภาพที่ 25 แรงเจาะทะลุ (A) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (B) ของเจลจากเนื้อกุ้งกุลาดำบดที่เตรียมโดยการใช้ความร้อน (25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง / 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที) การใช้ความดันสูง (0.1 200 400 600 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) หรือการใช้ความร้อนร่วมกับความดันสูง {(200 เมกกะปาสคาล / 25 องศาเซลเซียส /90 องศาเซลเซียส) (200 เมกกะปาสคาล / 90 (400 เมกกะปาสคาล / 25 องศาเซลเซียส / 90 องศาเซลเซียส) (400 เมกกะปาสคาล / 90 องศาเซลเซียส)}

Breaking force (A) and deformation values (B) of heat (25 °C, 2 hr / 90 °C, 20 min and 90 °C, 20 min), pressure (0.1 200 400 600 800 MPa for 20 min) or pressure-heat {(200 MPa / 25 °C / 90 °C) (200 MPa / 90 °C) (400 MPa / 25 °C / 90 °C) (400 MPa / 90 °C)} induced gels from minced black tiger shrimp.

The same letters indicate non significant differences ($p \geq 0.05$).

Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.



ภาพที่ 26 แรงเจาะทะลุ (A) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (B) ของเจลจากเนื้อกุ้งกุลาดำบดที่เติม {(25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง / 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที+BPP) และ (90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที+BPP)} และไม่เติมโปรตีนพลาสมาจากเลือดวัวร้อยละ 3 แล้วทำให้เกิดเจลโดยการใช้ความร้อน {(25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง / 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที) และ (90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที)}

Breaking force (A) and deformation values (B) of heat induced gels from minced black tiger shrimp muscle with (25 °C, 2 hr / 90 °C, 20 min + BPP and 90 °C, 20 min +BPP) and without (25 °C, 2 hr / 90 °C, 20 min and 90 °C, 20 min) 3 %beef plasma protein.

The same letters indicate non significant differences ($p \geq 0.05$).

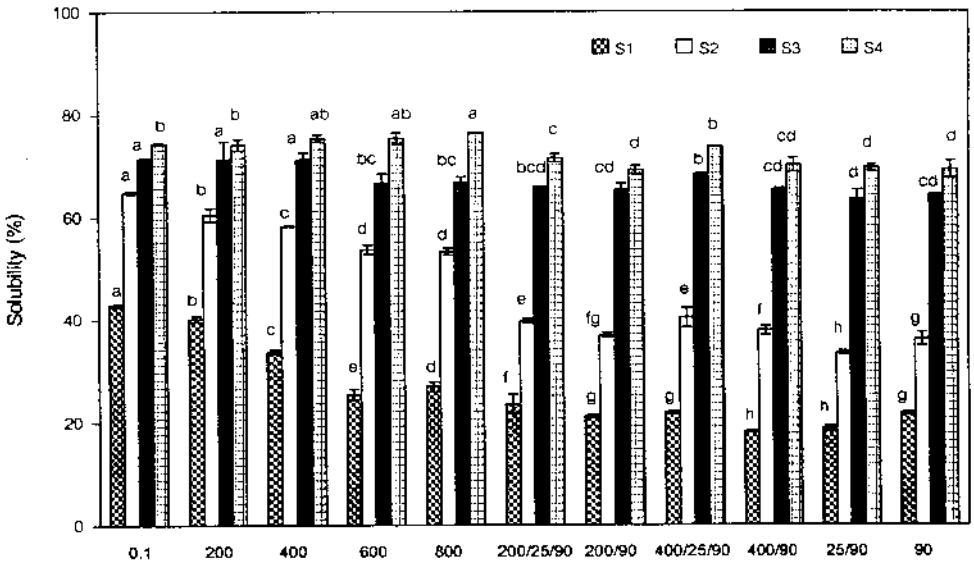
Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

4.4 **การละลายของโปรตีน**

จากภาพที่ 27 แสดงค่าการละลายของโปรตีนจากเจลกุ้งกุลาดำที่ทำให้เกิดเจลโดยการให้ความดัน การให้ความร้อน และการให้ความดันร่วมกับความร้อน ในสารละลายสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.6 โมลาร์ (S1) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 1 (S2) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 1 และ สารละลายยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ (S3) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 1 สารละลายยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ และสารละลายเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล ร้อยละ 2 (S4) จากการทดลองพบว่าค่าการละลายของโปรตีนในสารละลาย S1 ของเจลที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและเมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดันค่าจะลดลงเป็นลำดับ และค่าการละลายของโปรตีนที่ทำให้เกิดเจลด้วยความร้อน และเจลที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันร่วมกับความร้อนมีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองที่ใช้ความดันเพียงอย่างเดียวและชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ความดันเพิ่มจะทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนได้มากขึ้น ทำให้มีปริมาณไมโอไฟบริลตามธรรมชาติลดลง Messens และคณะ (1997) รายงานว่า ความดันสูงมีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนและภายหลังจะการเกิดการสร้างพันธะขึ้นมาใหม่ภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ส่วนการให้ความร้อนทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลอย่างรุนแรง ซึ่งนำไปสู่การทำลายทั้งพันธะโควาเลนต์ และพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (Okamoto *et al.*,1994)

ค่าการละลายในสารละลาย S2 ของตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันมีค่าเพิ่มขึ้นจากสารละลาย S1 ในสัดส่วนที่สูงกว่าตัวอย่างในชุดควบคุมและตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลด้วยความร้อนและเจลที่เกิดเจลด้วยความดันร่วมกับความร้อน แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล ตามด้วยการให้ความร้อน มีค่าการละลายสูงกว่าตัวอย่างที่เกิดเจลด้วยความร้อนและตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาลตามด้วยการให้ความร้อน และในสารละลาย S3 ตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันมีการเพิ่มขึ้นของค่าการละลายจากสารละลาย S2 ในสัดส่วนที่สูงกว่าตัวอย่างในชุดควบคุม แต่ต่ำกว่าตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลด้วยความร้อนและเจลที่เกิดเจลด้วยความดันร่วมกับความร้อน โดยที่ตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลด้วยความร้อนมีค่าสูงที่สุด ในสารละลาย S4 ตัวอย่างที่เกิดเจลด้วยความดันมีการเพิ่มขึ้นของค่าการละลายจากสารละลาย S3 ในสัดส่วนที่สูงกว่าตัวอย่างในชุดควบคุมและแต่ต่ำกว่าตัวอย่างที่เกิดเจลด้วยความร้อน แต่ตัวอย่างที่เกิดเจลด้วยความดันร่วมกับความร้อน ยกเว้นตัวอย่างที่เกิดเจลด้วยความดันตั้งแต่ 600 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที จะมีค่าสูงกว่า แสดงให้เห็นว่าความดันส่งเสริมให้เกิดการสร้าง

พันธะ โดยมีพันธะไฮโดรเจนในสัดส่วนที่สูงเมื่อเทียบกับพันธะไฮโดรโฟบิกและพันธะไดซัลไฟด์ ส่วนความร้อนและการให้ความดันร่วมกับความร้อนซึ่งมีสัดส่วนของพันธะไฮโดรโฟบิก และพันธะไดซัลไฟด์ที่สูงกว่าการเกิดพันธะไฮโดรเจนซึ่งส่งผลให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของเจลที่ได้ที่ได้จากความดันและความร้อนแตกต่างกัน (ภาพที่ 25B) นอกจากนี้ Messens และคณะ (1997) และ Angsupanich และ Ledward (1998) รายงานว่าพันธะไฮโดรเจนจะถูกสร้างขึ้นได้ภายใต้สภาวะการให้ความดันทำให้อัตราการละลายในสารละลาย S2 ของโปรตีนในตัวอย่างที่เกิดเจลด้วยความดันมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลด้วยความร้อนร่วมด้วยมีค่าต่ำกว่า เนื่องจากการให้อุณหภูมิสูงสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจน (Damodaran, 1996) Angsupanich และ Ledward (1998) กล่าวว่าความดันทำให้เกิดการสลายแรงกระทำระหว่างประจุและพันธะไฮโดรโฟบิก รวมทั้งทำให้เกิดการแตกออกของพันธะไฮโดรเจน แต่อย่างไรก็ตามภายหลังจากการปลดปล่อยความดันพันธะไฮโดรเจนจะถูกสร้างขึ้นเป็นอันดับแรก แรงกระทำระหว่างประจุและพันธะไฮโดรโฟบิกอาจถูกสร้างขึ้นภายหลัง จึงทำให้โครงสร้างหลักที่เกิดขึ้นภายหลังจากการให้ความดันจึงเป็นโครงข่ายของพันธะไฮโดรเจน ในขณะที่การให้ความร้อนทำให้เกิดการทำลายพันธะไฮโดรเจนก่อนแล้วอาจเกิดการทำลายแรงกระทำระหว่างประจุหรือพันธะไฮโดรโฟบิก แต่เมื่อทำให้เย็นแรงกระทำระหว่างประจุและพันธะไฮโดรโฟบิกจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนพันธะไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นภายหลัง ภายใต้สภาวะการให้ความดันและการให้ความร้อนส่งเสริมให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ Messens และคณะ (1997) รายงานว่า พันธะไดซัลไฟด์ เป็นพันธะที่มีบทบาทสำคัญที่ถูกสร้างขึ้นภายใต้สภาวะความดัน ซึ่งทำให้เกิดการรวมกลุ่ม (aggregation) และการเกิดเจลของโปรตีน การเพิ่มขึ้นของการรวมกลุ่มกันของโปรตีนอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลซึ่งเป็นผลมาจากการคลายตัวของโครงสร้างโปรตีน Angsupanich และ Ledward (1999) รายงานว่าทั้งการให้ความดันและการให้ความร้อนแก่เนื้อปลาคอดสามารถทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์



ภาพที่ 27 การละลายของโปรตีนของเจลจากเนื้อกุ้งกุลาดำบดที่เตรียมโดยการใช้ความร้อน (25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง / 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที) การใช้ความดันสูง (0.1 200 400 600 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที) หรือการใช้ความร้อนร่วมกับความดันสูง {(200 เมกกะปาสคาล / 25 องศาเซลเซียส / 90 องศาเซลเซียส) (200 เมกกะปาสคาล / 90 องศาเซลเซียส) (400 เมกกะปาสคาล / 25 องศาเซลเซียส / 90 องศาเซลเซียส) (400 เมกกะปาสคาล / 90 องศาเซลเซียส)}

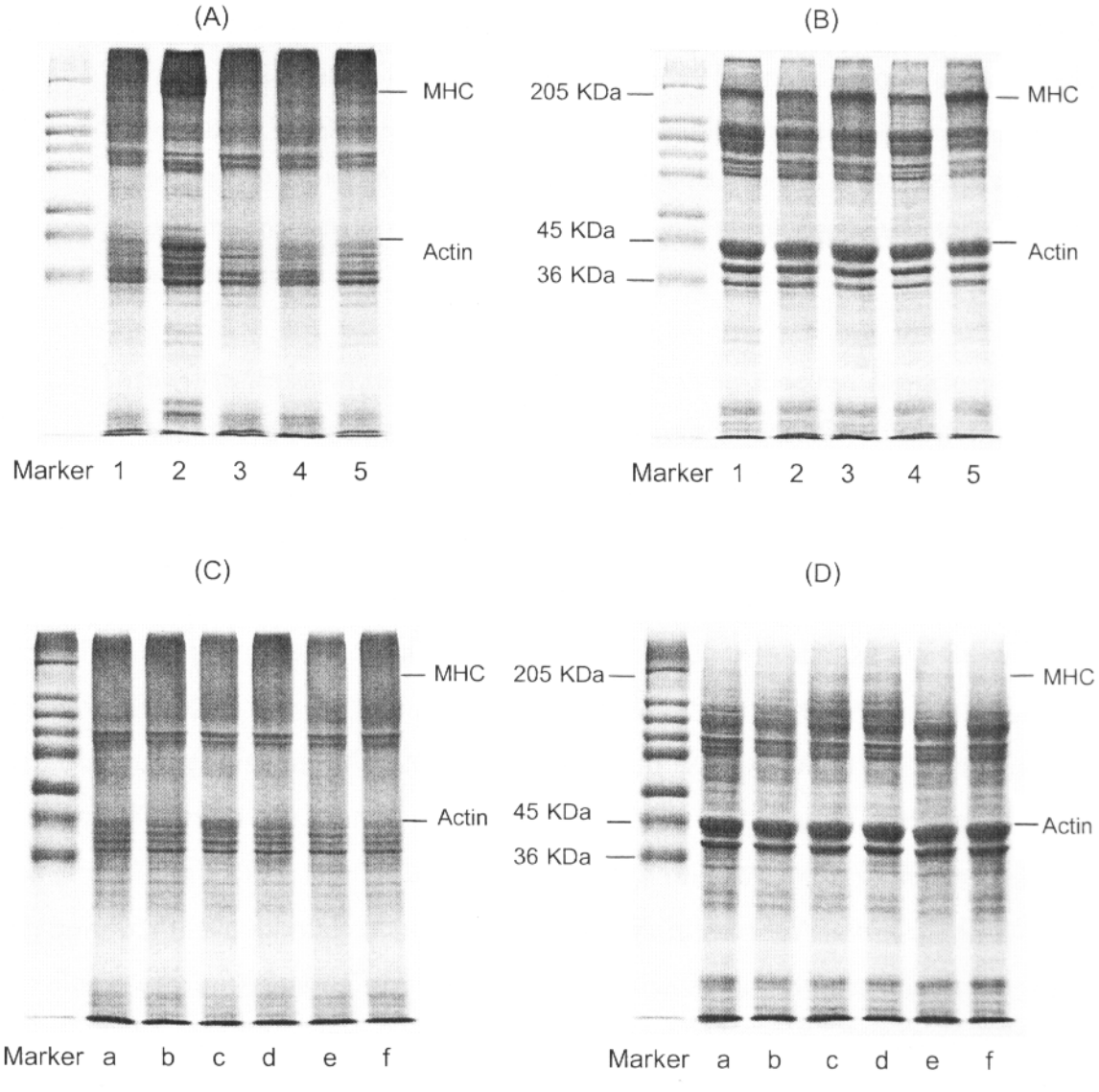
Protein solubility of heat (25 °C, 2 hr / 90 °C, 20 min and 90 °C, 20 min), pressure (0.1 200 400 600 800 MPa for 20 min) or pressure-heat {(200 MPa / 25 °C / 90 °C) (200 MPa / 90 °C) (400 MPa / 25 °C / 90 °C) (400 MPa / 90 °C)} induced gels from minced black tiger shrimp. The same letters under the same solubilizing mixture indicate non significant differences ($p \geq 0.05$).

Bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

4.5 รูปแบบของโปรตีนโดย SDS-PAGE

ทำการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนไมโอไฟบริลของเจลกุ้งกุลาดำ โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่ารูปแบบโปรตีนของเจลกุ้งกุลาดำที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดัน แบบนอนรีดิวซิง (ดังภาพที่ 28A) พบว่าแถบโปรตีนไมโอซินเส้นหนัก (Myosin heavy chain, MHC) ในชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล มีสีเข้มกว่าแถบของโปรตีน MHC ในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับสูงกว่าอย่างชัดเจน และจากภาพที่ 28B ซึ่งเป็นชุดการทดลองแบบรีดิวซิง ซึ่งมีการเติม β-mercaptoehanol เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ พบว่าแถบโปรตีน MHC ในชุดการ

ทดลองที่เกิดเจลด้วยความดันและชุดควบคุมไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างในชุดควบคุมมีโครงสร้างของโปรตีนที่จับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งเป็นพันธะที่พบโดยทั่วไปในโครงสร้างของโปรตีนไมโอซิน โดยทั่วไปไมโอซินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480,000 ดาลตัน ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 6 เส้น โดยมีไมโอซินเส้นหนัก 2 เส้น และไมโอซินเส้นเบา 4 เส้น (Foegeding *et al.*, 1996) จึงทำให้โปรตีนมีขนาดใหญ่ อาจค้างอยู่ด้านบนของแผ่นเจล แต่เมื่อให้ความดันที่ระดับ 200 เมกกะปาสคาล อาจทำให้เกิดการแยกตัวของโปรตีนไมโอซิน จึงทำให้เกิดการเข้มขึ้นของแถบโปรตีน MHC และผลจากการแยกตัวของโปรตีนอาจทำให้เกิดการเข้มขึ้นของแถบโปรตีนอื่นๆด้วย หลังจากให้ความดันตั้งแต่ 400 เมกกะปาสคาล แถบของโปรตีน MHC จะจางลง อาจเนื่องมาจากการให้ความดันตั้งแต่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล ส่งผลให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองค่าการละลายของโปรตีน (ภาพที่ 27) อาจเนื่องมาจากความดันทำให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ โดยความดันทำให้เกิดการคลายเกลียว ทำให้มีหมู่ซัลฟ์ไฮดริลเพิ่มขึ้นและเมื่อเกิดการออกซิเดชันของหมู่ดังกล่าวจึงส่งผลให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (Gilleland *et al.*, 1997) นอกจากนี้การให้ความดันไม่ทำให้แถบโปรตีน MHC ในชุดการทดลองแบบ reducing ของเจลที่ให้ความดันมีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าความดันไม่ได้ทำให้เกิดการสร้างพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์โดยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส ซึ่งสอดคล้องกับค่าการละลายของโปรตีนของตัวอย่างที่ให้ความดันที่มีค่าการละลายในสารละลาย S4 ที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 27) Angsupanich และ Ledward (1999) พบว่าการให้ความดันตั้งแต่ 600 เมกกะปาสคาล ทำให้เกิดการลดลงของแถบโปรตีน MHC ในชุดการทดลองแบบนอนรีดิวซิง แต่ไม่มีความแตกต่างของแถบโปรตีน MHC ในชุดการทดลองแบบรีดิวซิง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบแถบของโปรตีน MHC ในชุดการทดลองที่เกิดเจลด้วยความดันร่วมกับความร้อนและการให้ความร้อนในเจลแบบรีดิวซิง (ภาพที่ 28C) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน และจากภาพที่ 28D ซึ่งเป็นชุดการทดลองแบบรีดิวซิง พบว่าไม่ปรากฏแถบโปรตีน MHC และแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36,000 ดาลตัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแถบของโปรตีน Troponin T ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000-40,000 ดาลตัน และเกิดการเข้มขึ้นของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 36,000 ดาลตัน ซึ่งแถบของโปรตีนดังกล่าวในชุดการทดลองที่เกิดเจลด้วยความดันมีลักษณะจางกว่า แสดงให้เห็นว่าการให้ความดันร่วมกับความร้อนและการให้ความร้อนทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีน MHC และ Troponin T เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง เนื่องจากการให้ความร้อนอาจทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยการให้ความร้อนทำให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 55-70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานานประมาณ 10 นาที (ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 4) ซึ่งส่งผลต่อค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลที่ได้จากความร้อนมีค่าลดลง (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 28 รูปแบบของโปรตีนโดย SDS-PAGE ของเนื้อกุ้งกุลาดำบดที่เติมเกลือร้อยละ 2.5 ที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันสูง {0.1 (แถบ 1) 200 (แถบ 2) 400 (แถบ 3) 600 (แถบ 4) และ 800 (แถบ 5) เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที} หรือความร้อน {ความร้อนแบบสองขั้นตอน คือ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง / 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (แถบ e) และ แบบขั้นตอนเดียว คือ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (แถบ f)} และความดันร่วมกับความร้อน {200 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ร่วมกับความร้อนแบบสองขั้นตอน (แถบ a) 200 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ร่วมกับความร้อนแบบขั้นตอนเดียว (แถบ b) 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ร่วมกับความร้อนแบบสองขั้นตอน (แถบ c) 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ร่วมกับความร้อนแบบสองขั้นตอน (แถบ d) } โดยที่ภาพ A , C เป็นโปรตีนที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล และภาพ B, D เป็นโปรตีนที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล MHC: ไมโอซินเส้นหนัก

SDS-PAGE pattern of protein in the absence of β-mercaptoehanol (A,C) and in the presence of β-mercaptoethanol (B,D) for mince black tiger shrimp muscle added with 2.5% NaCl after

treated at different pressure for 20 min {0.1 (lane 1), 200 (lane 2), 400 (lane 3), 600 (lane 4), 800 (lane 5)} or heating {two step heating: 25 °C, 2 hr / 90 °C, 20 min (lane e) and one step heating: 90 °C, 20 min (lane f)} and combination treatment {200 MPa for 20 min pior to two step heating (lane a) 200 MPa for 20 min pior to one step heating (lane b) 400 MPa for 20 min pior to two step heating (lane c) and 400 MPa for 20 min pior to one step heating (lane d)}. MHC, myosin heavy chain.

4.6 **โครงสร้างทางจุลภาคของเจลกุ้งกุลาดำโดย** Scanning Electron Microscope (SEM)

จากการเปรียบเทียบคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของเจลกุ้งกุลาดำที่ทำให้เกิดเจลโดยการใช้ความร้อน ความดันสูง และความร้อนร่วมกับความดัน ทำการคัดเลือกสภาวะแล้วนำมาตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาค ดังนี้

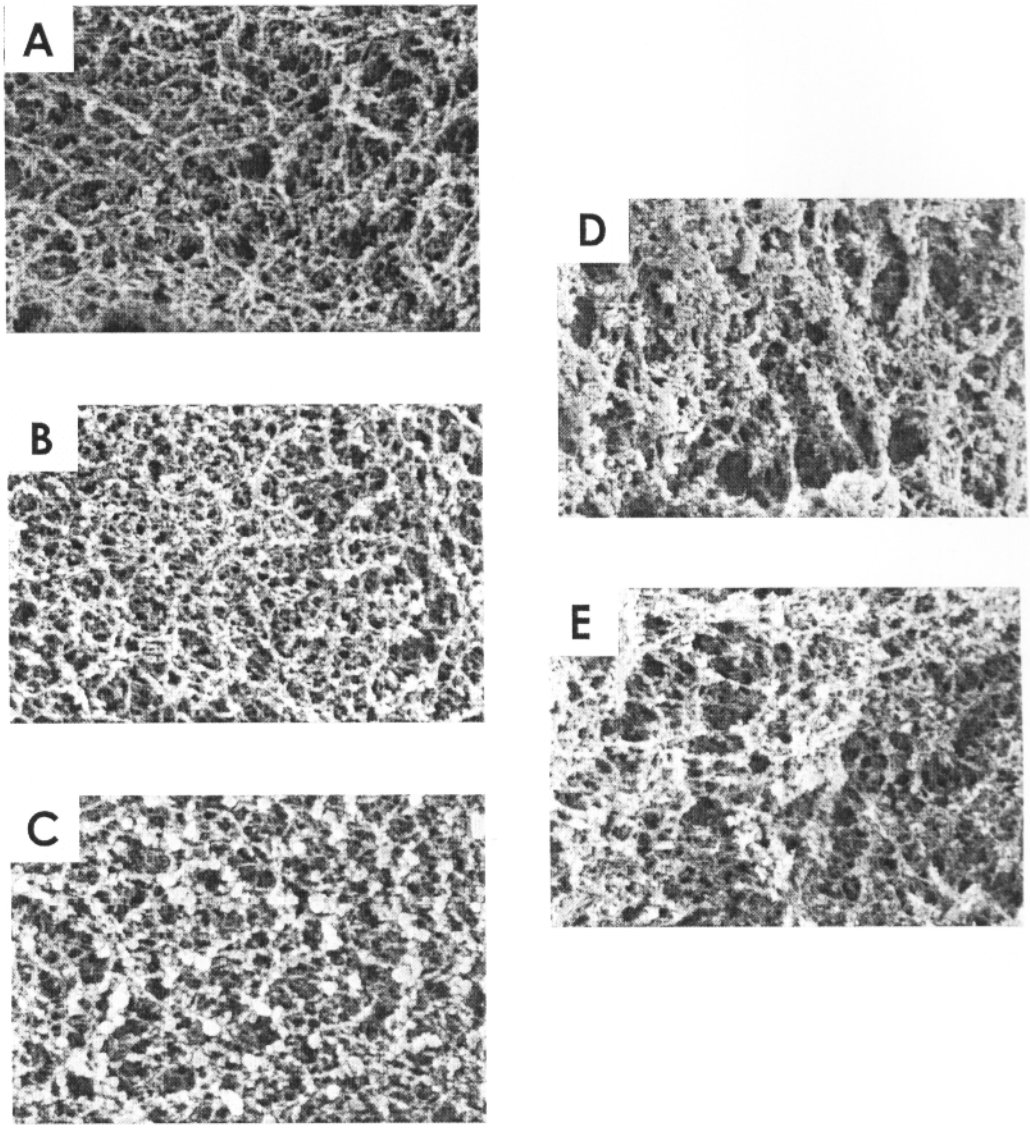
ชุดการทดลองที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดัน ทำการคัดเลือก 3 สภาวะ คือ เจลกุ้งกุลาดำที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันที่ระดับ 400 600 และ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ดังภาพที่ 29A 29B และ 29C ตามลำดับ) พบว่าโครงสร้างทางจุลภาคของเจลในชุดการทดลองที่มีการให้ความดันสูงเพียงอย่างเดียวมีลักษณะเป็นโครงข่ายร่างแห โดยชุดการทดลองที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล มีลักษณะเป็นโครงข่ายร่างแหที่มีการเชื่อมต่อกันอย่างหลวมๆ ซึ่งสังเกตได้จากช่องว่างภายในโครงสร้างของเจล (ภาพที่ 29A) แต่เมื่อทำให้กิดเจลโดยการให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาล พบว่าจะมีลักษณะที่เป็นโครงข่ายร่างแหที่เป็นระเบียบ มีความต่อเนื่องของเส้นใยโปรตีนและมีโครงข่ายร่างแหเชื่อมต่อกันแน่นขึ้น ทำให้แทบจะไม่ปรากฏช่องว่างภายในโครงสร้างของโปรตีน (ภาพที่ 29B) เมื่อเพิ่มระดับของการให้ความดันเป็น 800 เมกกะปาสคาล พบว่าเส้นใยโปรตีนหนาขึ้น มีลักษณะโครงข่ายร่างแหค่อนข้างหนาทึบปรากฏลักษณะของโครงข่ายโปรตีนที่เกิดการอัดแน่น และรวมกันเป็นกลุ่มก้อนตรงบริเวณที่เชื่อมต่อของโครงข่าย ส่งผลให้ปรากฏช่องว่างภายในโครงสร้างโปรตีน (ภาพที่ 29C) ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล เป็นสภาวะที่เนื้อกุ้งบดเริ่มเกิดเจล ซึ่งเกิดการเสียสภาพของโปรตีนต่ำกว่าการให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาล จึงทำให้เกิดการคลายเกลียวในโครงสร้างของโปรตีน รวมทั้งเกิดการสร้างแรงกระทำระหว่างโปรตีนต่ำกว่าการให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาล จึงทำให้เจลที่ให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาล มีโครงข่ายของโปรตีนที่มีความแข็งแรงมากกว่า แต่เมื่อให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล พบว่าความดันทำให้เกิดการอัดแน่นของโครงข่ายโปรตีนมากเกินไป และเกิดช่องว่างภายในโครงข่ายของโปรตีนจึงทำให้เกิดการสูญเสียน้ำมาก (ภาพที่ 24A) การสร้างโครงข่ายโปรตีนส่งผลต่อความแข็งแรงของเจล ดังจะเห็นได้จาก ภาพที่ 25 ซึ่งค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุของตัวอย่างที่ทำให้เกิดเจลโดยการให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาลมีค่าสูงที่สุด

และสอดคล้องกับลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจล ซึ่งมีโครงข่ายของโปรตีนที่มีการเชื่อมต่ออย่างหนาทึบและมีความต่อเนื่องมากที่สุด ส่วนตัวอย่างที่ให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล แม้ว่ามีค่าการสูญเสียน้ำมากกว่าชุดการทดลองที่ให้ความดัน 400 เมกกะปาสคาล แต่พบว่ามีโครงข่ายของเจลที่แน่นและหนาทึบกว่า จึงส่งผลให้มีค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุมากกว่า

ชุดการทดลองที่ทำให้เกิดเจลด้วยความร้อน ทำการคัดเลือกสภาวะที่มีการให้ความร้อนแบบ 2 ขั้นตอน คือ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่มีค่าแรงก่อนเจาะทะลุสูงกว่าสภาวะที่มีการให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียว เมื่อตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคของเจล พบว่ามีลักษณะโครงข่ายร่างแหที่ไม่เป็นระเบียบ มีการรวมตัวของโปรตีนเป็นกลุ่มและมีโครงข่ายของเส้นใยโปรตีนที่มีความต่อเนื่องน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น ทำให้ปรากฏช่องว่างขนาดใหญ่ (ภาพที่ 29D) เจลมีลักษณะโปร่งกว่าเจลที่เกิดเจลโดยการให้ความดัน และเจลที่เกิดเจลโดยการให้ความดันร่วมกับความร้อน ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนส่งเสริมให้เกิดการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจึงทำให้เกิดการสลายโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับผลของรูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ที่พบว่าโปรตีนไมโอซินเส้นหนักเกิดการย่อยสลาย จึงทำให้โปรตีนไม่สามารถเชื่อมต่อกันเป็นโครงข่ายโปรตีนที่มีความแข็งแรงได้ ทำให้ไม่สามารถกักเก็บน้ำไว้ภายในโครงข่ายของเจลได้ ส่งผลให้มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ (ภาพที่ 29B) และมีค่าแรงและระยะทางก่อนเจาะทะลุต่ำกว่าชุดที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดัน (ภาพที่ 25)

ชุดการทดลองที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันร่วมกับความร้อน ทำการคัดเลือกสภาวะที่มีการให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล แล้วให้ความร้อนแบบ 2 ขั้นตอน คือ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่มีค่าแรงก่อนเจาะทะลุสูงกว่าสภาวะอื่น เมื่อตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคของเจล พบว่ามีลักษณะเป็นโครงข่ายของโปรตีนร่างแหที่มีช่องว่างขนาดใหญ่และกระจายทั่วไป (ภาพที่ 29E) ทำให้ความต่อเนื่องของเส้นใยโปรตีนน้อยกว่าเจลกุ้งกุลาดำในทุกชุดการทดลองที่ทำให้เกิดเจลด้วยความดันเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเกิดจากการให้ความร้อนร่วมด้วยอาจทำให้เกิดการทำลายพันธะไฮโดรเจนซึ่งเป็นพันธะที่ทำให้โครงสร้างเจลที่ผ่านการให้ความดันมีความคงตัว (Angsupanich and Ledward, 1999) และทำให้เอนไซม์โปรติเอสสามารถมีกิจกรรมได้เพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีน โครงสร้างของเจลจึงมีช่องว่างขนาดใหญ่และไม่ต่อเนื่องกัน เจลที่ได้จึงมีความแข็งแรงต่ำลง ส่งผลให้มีแรงและระยะทางก่อนการเจาะทะลุที่ต่ำกว่าเจลที่ผ่านการให้ความดันและยังมีค่าการสูญเสียน้ำหนักต่ำที่สุด (ภาพที่ 24A) อย่างไรก็ตามเจลที่เกิดเจลโดยการให้ความดันร่วมกับความร้อนด้วยมีโครงข่ายของโปรตีนที่หนาแน่นกว่า และเป็นระเบียบกว่าเจลที่เกิดจากความร้อนเพียงอย่างเดียว

จึงทำให้เจลที่เกิดเจลด้วยความดันร่วมกับความร้อนมีความแข็งแรงมากกว่าเจลที่เกิดด้วยความร้อน ซึ่งสอดคล้องการทดลองของ Fernández-Martín และคณะ (1998) ซึ่งรายงานว่า เจลจากปลา Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) ที่ผ่านการให้ความดันที่ระดับ 375 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีโครงข่ายของเจลที่มีลักษณะอัดตัวกันแน่น และหนาทึบกว่าเจลที่ผ่านการให้ความร้อนแบบสองขั้นตอน คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที



ภาพที่ 29 โครงสร้างทางจุลภาคของเจลกุ้งกุลาดำที่ให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที (A); เจลกุ้งกุลาดำที่ให้ความดันที่ระดับ 600 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที (B); เจลกุ้งกุลาดำที่ให้ความดันที่ระดับ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที (C); เจลกุ้งกุลาดำที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (D); เจลกุ้งกุลาดำที่ให้ความดันที่ระดับ 400 เมกกะปาสคาล แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (E) (กำลังขยาย 10,000 เท่า)

Microstructure of black tiger shrimp gel prepared by different conditions: minced black tiger shrimp pressurized at 400 MPa (A); 600 MPa (B); 800 MPa for 20 min (C); heated at 25 °C, 20 min / 90 °C for 20 min (D); pressurized at 400 MPa for 20 min pior to heating at 25 °C, 20 min / 90 °C for 20 min (E). (magnification: 10,000X)