

ผลของ metal ion ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาเผาอบระหว่างการแช่เยือกแข็งทำละลาย

Effect of metal ion on quality changes of Basa pastes during freeze-thaw process

พรพิมล ศรีเกตุ^{1,2*}, ธรรมรักษ์ ละอองนวล³, รจนา นพตะนา², วสุมนัส ศรีวิเศษ²,
นงลักษณ์ พยัคฆศิรินาวิน², อธิพล แสนพันธ์⁴ และ โชชน ศรีเกตุ⁵
Pornpimol Sriket^{1,2*}, Thamarak La-ongnual³, Rodjana Noptana², Wasumanas Sriwises²,
Nongluck Payakkasirinawin², Theeraphol Senphan⁴ and Chodsana Sriket⁵

บทคัดย่อ

ผลของชนิดของโลหะ (FeCl_2 และ FeCl_3) และความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0-25 ppm) ต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน สี และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของเนื้อปลาเผาอบระหว่างการแช่เยือกแข็งทำละลายเป็นจำนวน 7 รอบ พบว่าค่า TBARS ของเนื้อปลาเผาอบตัวอย่างเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งทำละลายเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) การเพิ่มขึ้นของค่า TBARS ในเนื้อปลาเผาอบขึ้นกับความเข้มข้นของของเหล็กที่ใช้ การเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างเนื้อปลาเผาอบที่เติมเหล็กสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของค่า b^* (สีเหลือง) การเพิ่มขึ้นของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีน และการลดลงของค่าการละลายของโปรตีนเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดเมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งทำละลายเพิ่มขึ้น กิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ของ natural actomyosin (NAM) ที่สกัดจากเนื้อปลาเผาอบตัวอย่างลดลงเมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งทำละลายเพิ่มขึ้น การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าตัวอย่างเนื้อปลาเผาอบที่เติมเหล็กมีโปรตีนโมเลกุลใหญ่เกิดขึ้น ดังนั้นจากการศึกษานี้มีความเป็นไปได้ว่าเหล็กส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการเกิดสีเหลืองที่ผิดปกติในเนื้อปลาเผาอบที่มีผลรวมจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยเฉพาะเมื่อผ่านการแช่เยือกแข็งทำละลายจำนวนหลายรอบ

คำสำคัญ: ปลาเผาอบ, เหล็ก, การเปลี่ยนแปลงสี, การแช่เยือกแข็งทำละลาย

¹ สาขาวิชาธุรกิจอาหาร และโภชนาการ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34000

¹ Program in Food Business and Nutrition, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani 34000

² หน่วยพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและผลิตภัณฑ์อาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34000

² Unit of Agriculture and Food Products Development, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani 34000.

³ สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34000

³ 3Program in Fisheries, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani 34000

⁴ คณะวิศวกรรม และอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

⁴ Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Sansai, Chiangmai 50290

⁵ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34000

⁵ Program in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani 34000

Abstract

The effects of different metal ions (FeCl_2 and FeCl_3) concentrations (0-25 ppm) on the lipid oxidation, color, and protein changes of Basa (*Pangasius bocourti*) pastes subjected to multiple freeze-thaw cycles, were investigated. The thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) values of all samples increased as the number of freeze-thaw cycle increased ($p < 0.05$). The increase in TBARS values of Basa pastes induced by the presence of iron was dose dependent. Increases in lipid oxidation of the samples containing iron were concomitant with the increase in b^* value (yellowness). The increase in protein oxidation and decrease in protein solubility were more pronounced as the number of freeze-thaw cycles increased. Decreases in Ca^{2+} -ATPase activity of Basa natural actomyosin were found in all samples with increased freeze-thawing cycles. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis showed that proteins with high molecular weight were observed in the samples with added iron. Therefore, iron presumably increased the yellow discoloration in Basa muscle, associated with lipid oxidation, particularly with multiple freeze-thaw cycles.

Keywords: Basa, iron, discoloration, freeze-thaw

คำนำ

การบริโภคปลาน้ำจืดในกลุ่มปลาหนัง (Catfish) ได้แก่ ปลาสวาย และปลาเผาในประเทศไทยได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งน่าจะมาจากเหตุผลในด้านรสชาติและคุณค่าทางอาหาร ส่งผลให้ปัจจุบันพบว่าปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาหนังในกลุ่มสวาย โดยเฉพาะปลาเผาในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น นอกจากการเพาะเลี้ยงเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้ว ประเทศไทยยังส่งออกปลาหนังในรูปปลาแล้แห้งแช่เยือกแข็งเป็นมูลค่ากว่า 5 ล้านบาทต่อปี (ประจักษ์, 2559) ถึงแม้ว่าการแช่เยือกแข็งจะสามารถรักษาคุณภาพของสัตว์น้ำได้โดยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีกายภาพนั้นยังคงเกิดขึ้น ซึ่งในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งนั้นการสูญเสียสภาพธรรมชาติ และการตกตะกอนของโปรตีนนั้นยังเกิดขึ้นส่งผลให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เช่น การละลาย และความสามารถในการจับกับน้ำลดลง (Moral et al., 2002; Ruiz-Capillas et al., 2002) มีรายงานว่าปลาหนังแล้แห้งแช่เยือกแข็งมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ โดยเฉพาะการเกิดสีเหลืองของเนื้อปลาซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเกิดมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อ

ปลา นอกจากการเปลี่ยนแปลงสีแล้วเนื้อปลาแล้แห้งแช่เยือกแข็งยังมีเนื้อสัมผัสที่เหนียวขึ้นเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาดังกล่าวทำให้การยอมรับของผู้บริโภคลดลงส่งผลให้เกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าการปนเปื้อนของไอออนโลหะในน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ หรือการปนเปื้อนจากอุปกรณ์ระหว่างการจับสัตว์น้ำ และการเก็บรักษา ระหว่างขนส่งหรือแปรรูปอาจจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อปลา โดยผลิตภัณฑ์จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้แก่ peroxide, aldehyde และ ketone สามารถเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของโปรตีนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อปลาได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อปลาเผาเนื่องมาจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกล้ามเนื้อโปรตีนในปลาเผาที่เพาะเลี้ยงในประเทศ การศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลเหล่านี้จะช่วยในการพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมที่จะรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็ง ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีความเสี่ยงต่อการถูกปฏิเสธจากลูกค้าและผู้ส่งออกน้อยลง รวมทั้งส่งเสริมให้ผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็งของไทยสามารถแข่งขันในตลาดโลกได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ

metal ions ต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน การเปลี่ยนแปลงสี และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี ภายภาพของเนื้อปลาเพาะระหว่างกระบวนการแช่แข็งทำลาย

วัตถุประสงค์ และวิธีการทดลอง

1. วัตถุประสงค์ และวิธีการเตรียม

ปลาเพาะซื้อมาจากฟาร์มในจังหวัดนครพนม ขนาดประมาณ 2 กิโลกรัม/ตัว บรรจุในถุงพลาสติกเก็บ ในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ขนส่งมาที่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ภายในเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อมาถึงนำปลามาทำความสะอาด ในน้ำผสมน้ำแข็ง และทำการแลเนื้อปลาแยกหนังและก้าง ออก จากนั้นนำเนื้อปลาแลมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำ เนื้อปลาบดที่ได้ผสมกับไนโตรเจนเหลวและบดเป็นผงด้วย เครื่องบด (blender) นำเนื้อปลาผงมาผสมกับสารละลาย เหล็กที่ชนิด (FeCl_2 และ FeCl_3) และความเข้มข้น แตกต่างกัน (5 และ 25 ppm) ตัวอย่างควบคุมจะนำปลา บดผงมาผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการสเตอริไรส์ นำส่วนผสม ที่ได้มาบรรจุในถุงโพลีเอทิลีน และแช่แข็งที่ -20°C (air blast-freezer) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ ตัวอย่างมาทำลายด้วยน้ำที่อุณหภูมิ $25-27^\circ\text{C}$ จน อุณหภูมิแกนกลางประมาณ $0-2^\circ\text{C}$ ตัวอย่างผสมถูกนำมา แช่แข็งทำลายเป็นจำนวนรอบเท่ากับ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 รอบ จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ดังนี้

2. การวิเคราะห์

2.1 การวิเคราะห์ทางเคมีกายภาพ

1. ค่า Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) ตามวิธีของ Buege และ Aust (1978)
2. ค่าสี (L^* (ความสว่าง) a^* (สีแดง) b^* (สี เหลือง)) โดยวิธี CIE Hunter Lab ตามวิธี ของ Benjakul และคณะ (2008)
3. วิเคราะห์รูปแบบโปรตีนในเนื้อปลาโดยวิธี sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ 4% stacking gel และใช้ 10% running gel
4. การละลายของโปรตีนจากกล้ามเนื้อปลา ตามวิธีของ Benjakul และ Bauer (2000)

2.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

ตัวอย่างเนื้อปลาเพาะที่เติมและไม่เติม metal ions ที่ชนิดและความเข้มข้นแตกต่างกันและผ่านการแช่ แข็งทำลายจะถูกนำมาสกัด natural actomyosin (NAM) โดยวิธีของ Benjakul และคณะ (1997) จากนั้น นำสารละลาย NAM มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ปริมาณพื้นผิวไม่ชอบน้ำ (surface hydrophobicity) ของแอคโตไมโอซิน ธรรมชาติตามวิธีของ Benjakul และคณะ (1997)
2. ปริมาณซัลไฟดริลทั้งหมด (total sulfhydryl groups) ของแอคโตไมโอซินธรรมชาติตามวิธี ของ Benjakul และคณะ (1997)
3. ปริมาณพันธะไดซัลไฟด์ของแอคโตไมโอซิน ธรรมชาติตามวิธีของ Benjakul และคณะ (1997)
4. กิจกรรม Ca^{2+} ATPase ของแอคโตไมโอซิน ธรรมชาติ (natural actomyosin) ตามวิธีของ Benjakul และคณะ (1997)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละปัจจัยที่ศึกษา วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปัจจัยที่ศึกษาด้วย Duncans Multiple Range Test วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อประมวลผลทางสถิติ SPSS (SPSS 11 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ที่ ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS

การเปลี่ยนของค่า TBARS ของเนื้อปลาเพาะบด (Basa pastes) ที่เติมเหล็ก (FeCl_2 และ FeCl_3) ที่ระดับ แตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำลาย ซ้ำ พบว่าเริ่มต้นตัวอย่างปลาเพาะบดมีค่า TBARS 2.22, 4.02, 4.12, 3.42 และ 4.06 mg MDA/kg sample สำหรับตัวอย่าง control (ควบคุม) และตัวอย่างที่เติม เหล็ก Fe(II), 5 ppm, Fe(II), 25 ppm, Fe(III), 5 ppm และ Fe(III), 25 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากผลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าการเติมเหล็กลงไปในตัวอย่างไม่ดีปลา เเพาะโดยสังเกตได้จากค่า TBARS ที่สูงกว่า ($p < 0.05$) ตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเหล็ก (control) ซึ่งเหล็กที่เติมลงไปมี ผลทำให้เกิดการฟอร์มตัวของมาลอนไดอัลดีไฮด์

(malondialdehyde) ในทันทีในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง โดยมีรายงานว่าเหล็กมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ได้ (Maqsood และคณะ, 2012) เมื่อตัวอย่างผ่านการแช่แข็งทำลายมากกว่า 2 รอบ พบว่าส่งผลให้ค่า TBARS เพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่าง ($p < 0.05$) ยกเว้นกลุ่ม โดยพบว่าค่า TBARS เพิ่มขึ้นจาก 2.22 เป็น 9.10 mg MDA/kg sample (กลุ่มควบคุม), 4.02 เป็น 17.22 mg MDA/kg sample (Fe(II), 5 ppm), 4.12 เป็น 21.15 mg MDA/kg sample (Fe(II), 25 ppm), 3.42 เป็น 14.20 mg MDA/kg sample (Fe(III), 5 ppm) และ 4.06 เป็น 18.80 mg MDA/kg sample (Fe(III), 5 ppm)

การแช่แข็งทำลายซ้ำเป็นจำนวนหลายรอบส่งผลให้เกิดการจัดเรียงตัวหรือรวมตัวใหม่ของผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งทำให้โครงสร้างของโปรตีนถูกทำลายมากขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของจำนวนรอบ (Benjakul and Bauer, 2000) ซึ่ง Ali และคณะ (2016) ก็ได้รายงานว่า

การแช่แข็งทำลายซ้ำมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างของกล้ามเนื้อโปรตีนเพิ่มขึ้น กระบวนการแช่แข็งทำลายเป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายทางกายภาพของเมมเบรนของลิพิด (lipid membrane) ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยส่งผลต่อเนื่องให้เกิดการรวมตัวของสารประกอบได้แก่ อัลดีไฮด์ (aldehydes) และไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbons) ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันซึ่งสารเหล่านี้จะเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนส่งผลให้เกิดลักษณะสีที่ผิดปกติ (off-color) (Wasowicz et al, 2004) นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่า TBARS ในตัวอย่างที่เติมเหล็กมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมตลอดการแช่แข็งทำลาย ($p < 0.05$) โดยมีรายงานถึงผลของเหล็กและโปรตีนฮีม (heme protein) ต่อการเร่งการเกิดออกซิเดชันของไขมันปลา (Maqsood et al, 2012) ยิ่งไปกว่านั้นจากการทดลองนี้ยังพบว่าอัตราเร่งการเกิดออกซิเดชันของไขมันขึ้นอยู่กับฟอร์มของเหล็กและปริมาณที่ใช้

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARS ของเนื้อปลาเผาอบที่เติมเหล็กในฟอร์มและปริมาณแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำลายซ้ำ

Freeze-thaw cycles	TBARS values (mg MDA/kg sample)				
	Control	Fe(II), 5 ppm	Fe(II), 25 ppm	Fe(III), 5 ppm	Fe(III), 25 ppm
0	2.22±0.51 ^{dB}	4.02±0.25 ^{fA}	4.12±0.42 ^{fA}	3.42±0.55 ^{fA}	4.06±0.50 ^{fA}
1	2.52±0.45 ^{dE}	7.80±0.22 ^{eC}	9.82±0.45 ^{eA}	5.80±0.22 ^{eD}	8.82±0.11 ^{eB}
2	2.83±0.10 ^{dE}	10.02±0.41 ^{dC}	12.20±1.05 ^{dA}	7.44±0.15 ^{dD}	11.21±0.02 ^{dB}
3	5.77±0.10 ^{cE}	13.11±0.60 ^{CC}	16.11±0.41 ^{cA}	10.22±0.55 ^{cD}	15.22±0.05 ^{cB}
5	7.20±0.09 ^{bE}	15.20±1.10 ^{bC}	18.02±0.25 ^{bA}	12.10±0.45 ^{bD}	16.62±0.22 ^{bB}
7	9.10±0.41 ^{aE}	17.22±0.15 ^{aC}	21.15±1.00 ^{aA}	14.20±1.10 ^{aD}	18.80±0.50 ^{aB}

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงของค่าสี (color)

การเปลี่ยนของค่าสีของเนื้อปลาเผาอบที่เติมเหล็ก (FeCl₂ และ FeCl₃) ที่ระดับแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำลายซ้ำแสดงดังตารางที่ 2 สำหรับค่า L*, ตารางที่ 3 สำหรับค่า a* และ ตารางที่ 4 สำหรับค่า b* ผลการทดลองพบว่าการเติมเหล็กที่ระดับแตกต่างกันไม่มีผลต่อค่าสี (L*, a* และ b*) ของตัวอย่างเนื้อปลาอบโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) โดยตัวอย่างเนื้อปลาเผาอบแช่แข็งมีค่า L* เริ่มต้น

เท่ากับ 68 (ตารางที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามพบการลดลงของค่า L* เมื่อจำนวนรอบของการแช่แข็งทำลายเพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 61.02, 52.01, 46.55, 53.47 และ 49.45 สำหรับตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างที่เติมเหล็ก Fe(II), 5 ppm, Fe(II), 25 ppm, Fe(III), 5 ppm และ Fe(III), 25 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยเฉพาะตัวอย่างที่เติมเหล็กจะมีการลดลงของค่า L* อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า a* มีแนวโน้มลดลงเหมือนกับค่า L* เมื่อตัวอย่าง

ผ่านการแช่แข็งทำละลายเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของค่า a^* ระหว่างตัวอย่างที่เติมเหล็กและกลุ่มควบคุมที่จำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายเท่ากัน (ตารางที่ 3) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการลดลงของค่าสีแดงของเนื้อปลาเพาะบดน่าจะมีผลมาจากการถูกชะเม็ดสีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่แข็งทำละลาย โดยมีรายงานการวิจัยที่สอดคล้องกันของ Jeong และคณะ (2011) ซึ่งพบว่าค่า a^* และปริมาณโปรตีนฮีมของกล้ามเนื้อจากเนื้อวัวลดลงเมื่อจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งการเสื่อมสลายของสารสี (pigment) จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของกล้ามเนื้อโปรตีน (Alonso et al., 2016) ยังมีรายงานอีกว่าการแช่เยือกแข็งทำละลายซ้ำส่งผลต่อค่าการสูญเสียน้ำ (drip loss) และค่า a^* ของเนื้อหมู และกล้ามเนื้อปลาคาร์ป (*Ctenopharyngodon idella*) (Alonso et al., 2016; Cheng et al., 2016)

ค่าสีเหลือง หรือ b^* ของทุกตัวอย่างเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการแช่แข็งทำละลายเป็นจำนวน 5 รอบ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 13.08, 23.40, 27.21, 19.78 และ 26.27 สำหรับตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างที่เติมเหล็ก Fe(II), 5

ppm, Fe(II), 25 ppm, Fe(III), 5 ppm และ Fe(III), 25 ppm ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าค่า b^* ของตัวอย่างที่เติมเหล็กสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 4) พบว่าการเพิ่มขึ้นของการเกิดออกซิเดชันของไขมันมีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของสีเหลืองในตัวอย่างที่มีการเติมเหล็ก นอกจากนี้ยังพบว่าการค่อย ๆ เพิ่มขึ้นของค่า b^* ในตัวอย่างควบคุมสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นอย่างช้าของค่า TBARS (ตารางที่ 1) aldehydes และสารประกอบ carbonyl ได้แก่ heptanal, hexanal และ octanal ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันสามารถจับกับกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนได้ ปฏิกิริยาดังกล่าวจะส่งผลให้สีในอาหารและผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป เช่นการเกิดสีเหลือง หรือสีน้ำตาลส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคในผลิตภัณฑ์อาหารนั้น ๆ (Pokorny, 1981; Wasowicz et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยที่ได้รายงานถึงการเสื่อมคุณภาพของสัตว์น้ำได้แก่ การเกิดออกซิเดชันของไขมัน และการเปลี่ยนแปลงสี (discoloration) ที่เกิดจากการแช่แข็งทำละลายซ้ำ (Mousakhani-Ganjeh et al., 2015)

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของค่าสี L^* ของเนื้อปลาเพาะบดที่เติมเหล็กในฟอรั่มและปริมาณแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำ

Freeze-thaw cycles	L* value				
	Control	Fe(II), 5 ppm	Fe(II), 25 ppm	Fe(III), 5 ppm	Fe(III), 25 ppm
0	68.45±1.15 ^{aA}	68.23±1.12 ^{aA}	68.45±1.00 ^{aA}	68.40±0.95 ^{aA}	68.25±1.05 ^{aA}
1	65.22±1.10 ^{bA}	63.65±0.50 ^{bB}	57.60±1.26 ^{bC}	63.44±1.53 ^{bB}	57.45±0.51 ^{bC}
2	63.10±0.45 ^{cA}	61.40±0.65 ^{cB}	54.20±0.54 ^{cC}	61.59±0.85 ^{cB}	54.82±0.51 ^{cC}
3	62.50±0.50 ^{cA}	58.23±1.00 ^{dB}	52.10±1.05 ^{dC}	59.15±0.45 ^{dB}	52.16±0.45 ^{dC}
5	61.12±0.55 ^{dA}	54.10±0.65 ^{eB}	49.12±0.60 ^{eD}	55.14±0.21 ^{eB}	51.00±0.10 ^{eC}
7	61.02±0.66 ^{dA}	52.01±0.45 ^{fB}	46.55±0.41 ^{fD}	53.47±0.35 ^{fB}	49.45±0.55 ^{fC}

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของค่าสี a^* ของเนื้อปลาเพาะบดที่เติมเหล็กในฟาร์มและปริมาณแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำ

a* value					
Freeze-thaw cycles	Control	Fe(II), 5 ppm	Fe(II), 25 ppm	Fe(III), 5 ppm	Fe(III), 25 ppm
0	7.21±0.01 ^{aA}	7.20±0.04 ^{aA}	7.21±0.02 ^{aA}	7.20±0.05 ^{aA}	7.21±0.01 ^{aA}
1	6.00±0.01 ^{bA}	6.01±0.03 ^{bA}	5.97±0.01 ^{bA}	5.98±0.01 ^{bA}	5.98±0.02 ^{bA}
2	5.80±0.04 ^{cA}	5.82±0.05 ^{cA}	5.80±0.01 ^{cA}	5.81±0.01 ^{cA}	5.80±0.03 ^{cA}
3	4.92±0.03 ^{dA}	4.91±0.04 ^{dA}	4.93±0.03 ^{dA}	4.92±0.01 ^{dA}	4.89±0.03 ^{dA}
5	3.65±0.04 ^{eA}	3.60±0.03 ^{eA}	3.57±0.04 ^{eA}	3.57±0.03 ^{eA}	3.55±0.04 ^{eA}
7	3.58±0.05 ^{eA}	3.57±0.04 ^{eA}	3.52±0.03 ^{eA}	3.52±0.04 ^{eA}	3.49±0.04 ^{eA}

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของค่าสี b^* ของเนื้อปลาเพาะบดที่เติมเหล็กในฟาร์มและปริมาณแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำ

b* value					
Freeze-thaw cycles	Control	Fe(II), 5 ppm	Fe(II), 25 ppm	Fe(III), 5 ppm	Fe(III), 25 ppm
0	6.10±0.22 ^{eA}	6.13±0.03 ^{eA}	6.11±0.02 ^{eA}	6.10±0.01 ^{eA}	6.11±0.02 ^{eA}
1	7.75±0.30 ^{dD}	12.59±0.10 ^{dB}	15.51±0.08 ^{dA}	10.34±0.21 ^{dC}	13.42±0.09 ^{dB}
2	8.50±0.10 ^{CD}	16.69±0.22 ^{CB}	21.49±0.15 ^{CA}	12.25±0.10 ^{CC}	20.33±0.20 ^{CA}
3	11.25±0.09 ^{BD}	18.63±0.11 ^{BB}	23.64±0.21 ^{BA}	14.72±0.12 ^{BC}	23.26±0.07 ^{BA}
5	13.08±0.10 ^{AD}	23.40±0.20 ^{AB}	27.21±0.12 ^{AA}	19.78±0.24 ^{AC}	26.27±0.22 ^{AA}
7	13.32±0.24 ^{AE}	23.10±0.05 ^{AC}	26.55±0.24 ^{AA}	21.59±0.34 ^{AD}	24.15±0.32 ^{AB}

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวไม่ชอบน้ำ (surface hydrophobicity; SoANS)

การเปลี่ยนของ SoANS ของแอกโตไมโอซินธรรมชาติ (natural actomyosin; NAM) สกัดจากเนื้อปลาเพาะบดที่เติมเหล็ก (FeCl_2 และ FeCl_3) ที่ระดับแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำแสดงดังตารางที่ 5 พบว่าเริ่มต้น NAM ที่สกัดจากตัวอย่างปลาเพาะบดมีค่า SoANS ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 82.22, 81.12, 80.46, 81.45 และ 81.10 สำหรับตัวอย่าง control (ควบคุม) และตัวอย่างที่เติมเหล็ก Fe(II), 5 ppm, Fe(II), 25 ppm, Fe(III), 5 ppm และ Fe(III), 25 ppm ตามลำดับ โดยทั่วไปพบว่าค่า SoANS ของทุกตัวอย่างเพิ่มขึ้นในช่วง

5 รอบของการแช่แข็งทำละลาย ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5) โดยมีค่าเท่ากับ 97.83, 101.0, 104.0, 100.0 และ 101.2 สำหรับตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างที่เติมเหล็ก Fe(II), 5 ppm, Fe(II), 25 ppm, Fe(III), 5 ppm และ Fe(III), 25 ppm ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าหลังจากนั้นไม่มีความแตกต่างของค่า SoANS ในทุกตัวอย่าง ($p > 0.05$) โดยผลที่ได้สอดคล้องกับ Sriket และคณะ (2007) ซึ่งรายงานการเพิ่มขึ้นของ SoANS ของ NAM ที่สกัดจากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายเป็นจำนวน 5 รอบ การเพิ่มขึ้นของ SoANS ในตัวอย่างเนื้อปลาเพาะบดที่ผ่านการแช่แข็งทำละลายซ้ำในการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่พบการ

เพิ่มขึ้นของ SoANS ในสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ระหว่างการเก็บแบบแช่เยือกแข็งเช่นกัน (Kobayashi and Park, 2017; Li et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการออกซิเดชันของโปรตีน เช่น การเพิ่มขึ้นของ SoANS มีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของการออกซิเดชันของไขมัน (Kong et al., 2013; Xia et al., 2009) ซึ่งแสดง

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของค่าพื้นผิวไม่ชอบน้ำ (surface hydrophobicity; SoANS) ของ NAM สกัดจากเนื้อปลาเผาอบที่เติมเหล็กในฟอรัมและปริมาณแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำ

Surface hydrophobicity (SoANS)					
Freeze-thaw cycles	Control	Fe(II), 5 ppm	Fe(II), 25 ppm	Fe(III), 5 ppm	Fe(III), 25 ppm
0	82.22±1.20 ^{eA}	81.12±0.72 ^{eA}	80.46±0.88 ^{eA}	81.45±1.20 ^{eA}	81.10±0.72 ^{eA}
1	88.45±1.01 ^{dA}	89.20±2.02 ^{dA}	89.10±1.05 ^{dA}	89.55±2.05 ^{dA}	89.22±1.22 ^{dA}
2	92.56±1.21 ^{cB}	96.15±1.05 ^{cA}	97.10±1.20 ^{cA}	96.78±0.42 ^{cA}	97.22±0.32 ^{cA}
3	95.50±0.82 ^{bC}	98.75±0.51 ^{bB}	102.22±0.22 ^{bA}	98.55±0.55 ^{bB}	99.20±0.12 ^{bB}
5	97.83±1.05 ^{aC}	101.00±1.25 ^{aB}	104.02±1.02 ^{aA}	100.00±1.22 ^{aB}	101.24±0.85 ^{aA}
7	98.62±1.00 ^{aB}	99.70±1.00 ^{aB}	106.65±1.20 ^{aA}	99.70±0.20 ^{aB}	104.35±1.42 ^{aA}

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

การเปลี่ยนแปลงของหมู่ซัลไฟด์ไฮดริล (sulfhydryl) และพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond)

การเปลี่ยนของปริมาณหมู่ซัลไฟด์ไฮดริล และพันธะไดซัลไฟด์ของแอกโตไมโอซินธรรมชาติ (natural actomyosin; NAM) สกัดจากเนื้อปลาเผาอบที่เติมเหล็ก (FeCl₂ และ FeCl₃) ที่ระดับแตกต่างกัน (0-25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำแสดงดังตารางที่ 6 และ 7 จากผลการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่าง (p>0.05) ของปริมาณหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลระหว่างตัวอย่าง NAM ในช่วงเริ่มต้น โดย NAM ที่สกัดจากเนื้อปลาเผาอบที่มีค่าหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลมีค่าเท่ากับ 6.85 (ตารางที่ 6) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลของทุกตัวอย่างลดลงเมื่อจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 6) โดยเมื่อผ่านการแช่แข็งทำละลายครบ 5 รอบพบว่ามีความแตกต่างของหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลระหว่างตัวอย่าง (p<0.05) โดยพบว่าปริมาณหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลเท่ากับ 6.51, 6.42, 6.41, 6.42 และ 6.42 สำหรับตัวอย่าง control (ควบคุม) และตัวอย่างที่เติมเหล็ก Fe(II), 5 ppm, Fe(II), 25 ppm, Fe(III), 5 ppm และ Fe(III), 25 ppm ตามลำดับ หมู่ซัลไฟด์ไฮดริลมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเฉพาะในสภาวะการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง (Benjakul and Bauer, 2000) เมื่อ

ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนน่าจะเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมัน (Tokur and Korkmaz, 2007) แต่ถึงกระนั้นจากงานวิจัยครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างเด่นชัดของค่า SoANS ระหว่างตัวอย่างที่เติมเหล็กและตัวอย่างควบคุม

ทำให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนน่าจะเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมัน (Tokur and Korkmaz, 2007) แต่ถึงกระนั้นจากงานวิจัยครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างเด่นชัดของค่า SoANS ระหว่างตัวอย่างที่เติมเหล็กและตัวอย่างควบคุม

ตัวอย่างผ่านการแช่แข็งทำละลายเป็นจำนวน 3 รอบพบว่าไม่มีความแตกต่างของหมู่ซัลไฟด์ไฮดริล (p>0.05) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านการแช่แข็งเกิน 3 รอบพบว่าตัวอย่างที่เติมเหล็กทุกความเข้มข้นมีปริมาณหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลค่อนข้างต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (p<0.05) ดังนั้นการเติมเหล็กโดยเฉพาะ iron (II) และในปริมาณสูงน่าจะมีผลในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลของเนื้อปลาเผาอบระหว่างการแช่เยือกแข็งทำละลายซ้ำ ซึ่งงานวิจัยแตกต่างจาก Thanonkaew และคณะ (2006) ซึ่งรายงานว่าไม่มีความแตกต่างของหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลระหว่างตัวอย่างหมึกกระดอง (cuttlefish) บดที่เติมเหล็กกับตัวอย่างควบคุมระหว่างการแช่เยือกแข็งทำละลายซ้ำ ซึ่งความสามารถของเหล็กในการเร่งการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในสัตว์น้ำอาจขึ้นกับชนิดของสัตว์น้ำ โดย Tokur และคณะ (2007) รายงานว่าการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนซึ่งเร่งด้วยเหล็กจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสัตว์น้ำ

การเปลี่ยนแปลงของพันธะไดซัลไฟด์ของ NAM สกัดจากเนื้อปลาเผาอบแช่ที่ผ่านการเยือกแข็งทำละลายซ้ำแสดงดังตารางที่ 7 โดยทั่วไปไม่พบความแตกต่างของพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างตัวอย่างเมื่อผ่านการแช่เยือกแข็งทำละลายเป็นจำนวน 1 รอบโดยพบว่าตัวอย่างควบคุม

และตัวอย่างที่เติมเหล็กมีปริมาณพันธะไดซัลไฟด์อยู่ในช่วง 7.70 ถึง 7.74 (ตารางที่ 7) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ของพันธะไดซัลไฟด์ในทุกตัวอย่างโดยไม่ขึ้นกับชนิดและปริมาณเหล็กที่ใช้ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำเป็นจำนวน 3 รอบ (ตารางที่ 7) พบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างตัวอย่างที่เติมเหล็กและตัวอย่างควบคุมเมื่อผ่านการแช่แข็งทำละลายเป็นจำนวน 3 รอบ ($p > 0.05$) แต่หลังจากนั้นพบว่าตัวอย่างที่เติมเหล็กมีปริมาณพันธะไดซัลไฟด์สูงกว่าตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 8.55, 8.72, 9.22, 8.65, 8.50 และ 9.10 สำหรับตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างที่เติมเหล็ก Fe(II), 5 ppm, Fe(II), 25 ppm, Fe(III), 5 ppm และ Fe(III), 25 ppm ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์สอดคล้องกับ

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงค่าหมู่ซัลไฟด์ไฮดริล (sulfhydryl group) ของ NAM สกัดจากเนื้อปลาเผาอบที่เติมเหล็กในฟอรัม และปริมาณแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำ

Sulfhydryl content					
Freeze-thaw cycles	Control	Fe(II), 5 ppm	Fe(II), 25 ppm	Fe(III), 5 ppm	Fe(III), 25 ppm
0	6.85±0.01 ^{aA}	6.85±0.01 ^{aA}	6.85±0.02 ^{aA}	6.85±0.01 ^{aA}	6.85±0.01 ^{aA}
1	6.75±0.03 ^{bA}	6.75±0.01 ^{bA}	6.76±0.02 ^{bA}	6.76±0.02 ^{bA}	6.75±0.02 ^{bA}
2	6.62±0.02 ^{cA}	6.57±0.03 ^{cA}	6.56±0.03 ^{cA}	6.56±0.02 ^{cA}	6.57±0.02 ^{cA}
3	6.53±0.02 ^{dA}	6.50±0.03 ^{dA}	6.46±0.01 ^{dB}	6.50±0.03 ^{dA}	6.45±0.02 ^{dB}
5	6.51±0.01 ^{eA}	6.42±0.01 ^{eB}	6.41±0.01 ^{eB}	6.42±0.04 ^{eB}	6.41±0.01 ^{eB}
7	6.48±0.01 ^{fA}	6.35±0.05 ^{fB}	6.37±0.02 ^{fB}	6.38±0.01 ^{fB}	6.38±0.01 ^{fB}

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงค่าพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ของ NAM สกัดจากเนื้อปลาเผาอบที่เติมเหล็กในฟอรัม และปริมาณแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำ

Disulfide bond content					
Freeze-thaw cycles	Control	Fe(II), 5 ppm	Fe(II), 25 ppm	Fe(III), 5 ppm	Fe(III), 25 ppm
0	7.70±0.01 ^{aA}	7.70±0.02 ^{aA}	7.71±0.02 ^{aA}	7.70±0.01 ^{aA}	7.71±0.02 ^{aA}
1	7.72±0.02 ^{aA}	7.73±0.01 ^{aA}	7.73±0.01 ^{aA}	7.73±0.02 ^{aA}	7.74±0.01 ^{aA}
2	7.95±0.04 ^{bA}	7.99±0.05 ^{bA}	8.07±0.05 ^{bA}	7.98±0.03 ^{bA}	8.06±0.01 ^{bA}
3	8.12±0.01 ^{cA}	8.10±0.01 ^{cA}	8.12±0.01 ^{cA}	8.10±0.01 ^{cA}	8.12±0.01 ^{cA}
5	8.40±0.01 ^{dB}	8.50±0.04 ^{dA}	8.65±0.01 ^{dA}	8.50±0.03 ^{dA}	8.60±0.02 ^{dA}
7	8.55±0.01 ^{eB}	8.72±0.04 ^{eA}	9.22±0.01 ^{eA}	8.65±0.05 ^{eA}	9.10±0.05 ^{eA}

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การลดลงของหมู่ซัลไฟด์ไฮดริล (ตารางที่ 6) จากผลวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการแช่แข็งทำละลายมีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลซึ่งส่งผลให้พันธะไดซัลไฟด์ในตัวอย่างสูงขึ้น การเปลี่ยนหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลไปเป็นพันธะไดซัลไฟด์ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิเดชันอื่น ๆ เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระและการออกซิเดชันของโปรตีน (Dean, 1997) มีรายงานเกี่ยวกับการลดลงของหมู่ซัลไฟด์ไฮดริลของตัวอย่างซูริมิจากปลาแคร์บ (Cyprinus carpio) ที่มีผลมาจากการแช่เยือกแข็ง และการทำละลายซ้ำ (Kong et al., 2013; Li et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าการรวมตัวกันของโปรตีนกลายเป็นโมเลกุลใหญ่ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเหนี่ยวนำด้วยการเติม (Tokur et al., 2007)

การเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรม ATPase (Ca^{2+} -ATPase activity)

การเปลี่ยนแปลงของค่า Ca^{2+} -ATPase activity ของแอกโตไมโอซินธรรมชาติ (natural actomyosin; NAM) สกัดจากเนื้อปลาเผาบบดที่เติมเหล็ก (FeCl_2 และ FeCl_3) ที่ระดับแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทะเลาะซ้ำแสดงดังตารางที่ 8 โดยเริ่มต้นไม่พบความแตกต่างของกิจกรรม ATPase ระหว่างตัวอย่างทดลอง ($p>0.05$) โดย NAM สกัดจากเนื้อปลาเผาบบดมีค่ากิจกรรม ATPase เท่ากับ 0.26 แต่อย่างไรก็ตามพบการลดลงของ Ca^{2+} -ATPase activity ในทุกตัวอย่างเมื่อจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายเพิ่มสูงขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างของกิจกรรม ATPase ระหว่างตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมเหล็กเมื่อตัวอย่างผ่านการแช่แข็งทำละลายเป็นจำนวน 2 รอบ ($p>0.05$) ซึ่งสาเหตุที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงน่าจะเป็นผลมาจากการที่โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปหรืออาจเกิดจากการรวมตัวกันของโปรตีนเป็นโมเลกุลใหญ่ทำให้เสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่โดยเฉพาะโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ โดย Benjakul และ Bauer (2000) กล่าวว่าอัตราการลดลงของกิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ในตัวอย่างสัตว์น้ำเมื่อจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายเพิ่มสูงขึ้นน่าจะเกิดจากการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซิน (myosin denaturation) โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณส่วนหัวของไม

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรม ATPase (Ca^{2+} -ATPase activity) ของ NAM สกัดจากเนื้อปลาเผาบบดที่เติมเหล็กในฟอร์มและปริมาณแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทะเลาะซ้ำ

Ca^{2+} -ATPase activity					
Freeze-thaw cycles	Control	Fe(II), 5 ppm	Fe(II), 25 ppm	Fe(III), 5 ppm	Fe(III), 25 ppm
0	0.26±0.01 ^{aA}	0.26±0.01 ^{aA}	0.26±0.01 ^{aA}	0.26±0.01 ^{aA}	0.26±0.01 ^{aA}
1	0.24±0.00 ^{bA}	0.24±0.01 ^{bA}	0.23±0.00 ^{bA}	0.24±0.01 ^{bA}	0.23±0.01 ^{bA}
2	0.23±0.00 ^{cA}	0.22±0.01 ^{cA}	0.20±0.01 ^{cA}	0.23±0.01 ^{cA}	0.20±0.01 ^{cA}
3	0.22±0.01 ^{dA}	0.21±0.01 ^{dA}	0.17±0.01 ^{dB}	0.22±0.01 ^{dA}	0.17±0.00 ^{dB}
5	0.20±0.01 ^{eA}	0.18±0.01 ^{eB}	0.15±0.01 ^{eC}	0.18±0.01 ^{eB}	0.15±0.00 ^{eC}
7	0.18±0.01 ^{fA}	0.15±0.01 ^{fB}	0.13±0.01 ^{fC}	0.16±0.01 ^{fB}	0.13±0.00 ^{fC}

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การเปลี่ยนแปลงการละลายของโปรตีนจากกล้ามเนื้อปลาเผา

โอซิน (myosin globular head) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ATPase โดยทำหน้าที่ในการสลาย ATP เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงาน Kobayashi และ Park (2017) รายงานว่ากิจกรรม ATPase ของ NAM สกัดจากปลาไนล์ (*Oreochromis niloticus*) แช่เยือกแข็งลดลงเมื่อเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับกับรายงานของ Kong และคณะ (2013) ซึ่งพบว่ากิจกรรม ATPase ของ NAM ที่สกัดจากซูริมิจากปลาคาร์บลดลงระหว่างกระบวนการแช่แข็งทำละลาย ผลการวิจัยที่ได้สอดคล้องกันกับการเพิ่มขึ้นของ SoANS (ตารางที่ 5) และการเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์ (ตารางที่ 7) ของตัวอย่างเนื้อปลาเผาบบดเมื่อจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งผลที่ได้นี้เป็นการยืนยันการเสียสภาพธรรมชาติและการรวมตัวกันของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาเผาบบดผ่านการแช่แข็งทำละลายซ้ำ แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่ากิจกรรม ATPase ของตัวอย่างที่เติมเหล็กมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมเมื่อจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายมากกว่า 3 รอบ ($p<0.05$) โดยมีค่ากิจกรรม ATPase เท่ากับ 0.18, 0.15, 0.13, 0.16 และ 0.13 สำหรับตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมเหล็ก Fe(II), 5 ppm, Fe(II), 25 ppm, Fe(III), 5 ppm และ Fe(III), 25 ppm ตามลำดับ ดังนั้นการลดลงของกิจกรรม ATPase น่าจะมีสาเหตุหลักมาจากจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายที่สูงขึ้น

การเปลี่ยนแปลงการละลายของโปรตีนใน 0.6 M KCl ของเนื้อปลาเผาบบดที่เติมเหล็ก (FeCl_2 และ FeCl_3) ที่ระดับแตกต่างกัน (0-25 ppm) ระหว่างการแช่

แข็งทะเลแช่แข็งแสดงดังตารางที่ 9 จากผลการวิจัยพบว่าไม่มีความแตกต่างของการละลายของโปรตีนระหว่างตัวอย่างเนื้อปลาเผาสด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 2 รอบ พบว่าการละลายของโปรตีนในทุกตัวอย่างลดลง ($p < 0.05$) โดยไม่ขึ้นการเติมหรือไม่เติมเหล็ก โดยการลดลงของการละลายสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริล (ตารางที่ 6) และการลดลงของกิจกรรม ATPase (ตารางที่ 8) การเพิ่มขึ้นของ SoANS (ตารางที่ 4.5) และการเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์ (ตารางที่ 4.7) โดยเมื่อตัวอย่างเนื้อปลาเผาสดผ่านการแช่เยือกแข็งทำละลายเป็นจำนวน 3 พบว่ามีความแตกต่างของค่าการละลายของโปรตีนระหว่างตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างที่เติมเหล็กโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 89.90, 87.80, 87.96, 87.80 และ 87.89 สำหรับตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมเหล็ก Fe(II), 5 ppm, Fe(II), 25 ppm, Fe(III), 5 ppm และ Fe(III), 25 ppm ตามลำดับ ซึ่งการลดลงของการละลายของโปรตีนสามารถใช้เป็นตัวบ่งบอกการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ การลดลงของการละลายอาจเนื่องมาจากการตกตะกอนของโปรตีนระหว่างแช่เยือกแข็ง หรือระหว่างกระบวนการแช่แข็งทำละลาย (Cheung et al., 2009) ซึ่งการรวมตัวกันของพันธะไดซัลไฟด์ และการจับกันของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ

(hydrophobic interaction) ระหว่างการเก็บแบบแช่เยือกแข็งจะส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน (Kingwascharapong and Benjakul, 2016) Li และคณะ (2013) รายงานว่าการละลายของโปรตีนของซูริมาจากปลาคาร์บลดลงเมื่อเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลานาน

เป็นที่สังเกตได้ว่าการละลายของโปรตีนในตัวอย่างที่เติมเหล็กมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมเมื่อผ่านการแช่แข็งทำละลายเป็นจำนวนมากกว่า 2 รอบ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับค่ากิจกรรม ATPase ที่ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 8) เมื่อจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายเพิ่มขึ้น นอกจากจำนวนรอบของการแช่แข็งทำละลายจะมีผลต่อการละลายของโปรตีนแล้ว การเติมเหล็กในฟอร์มและปริมาณต่างกันยังมีผลต่อการลดลงของการละลายของโปรตีนของเนื้อปลาเผาสด โดยยังมีรายงานว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น การรวมตัวกันเป็นโมเลกุลใหญ่ และการสูญเสียการละลาย มีสาเหตุมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างกระบวนการแช่แข็งทำละลาย (Ooizumi and Xiong, 2004) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับการออกซิเดชันของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากเหล็กในบางชนิด เช่น sardine, Atlantic bonito และ bluefish (Tokur et al., 2007)

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงการละลายของโปรตีน (protein solubility) ของเนื้อปลาเผาสดที่เติมเหล็กในฟอร์มและปริมาณแตกต่างกัน (0 และ 25 ppm) ระหว่างการแช่แข็งทำละลายซ้ำ

Protein solubility (%)					
Freeze-thaw cycles	Control	Fe(II), 5 ppm	Fe(II), 25 ppm	Fe(III), 5 ppm	Fe(III), 25 ppm
0	94.00±1.20 ^{aA}	94.00±1.00 ^{aA}	93.70±1.02 ^{aA}	94.00±1.05 ^{aA}	93.50±1.20 ^{aA}
1	92.08±1.00 ^{aA}	92.55±0.45 ^{aA}	91.85±0.55 ^{aA}	92.05±1.00 ^{aA}	91.94±1.00 ^{aA}
2	90.20±0.50 ^{bA}	89.88±0.20 ^{bA}	89.89±0.10 ^{bA}	89.89±0.40 ^{bA}	89.68±0.50 ^{bA}
3	89.90±0.10 ^{bA}	87.80±0.30 ^{CB}	87.96±0.22 ^{CB}	87.80±0.43 ^{CB}	87.89±0.54 ^{CB}
5	87.50±0.33 ^{CA}	85.80±0.32 ^{dB}	82.80±0.38 ^{DC}	85.80±0.22 ^{dB}	83.80±0.34 ^{DC}
7	85.80±0.27 ^{DA}	83.80±0.23 ^{EB}	80.80±0.44 ^{EC}	83.80±0.50 ^{EB}	80.80±0.52 ^{EC}

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

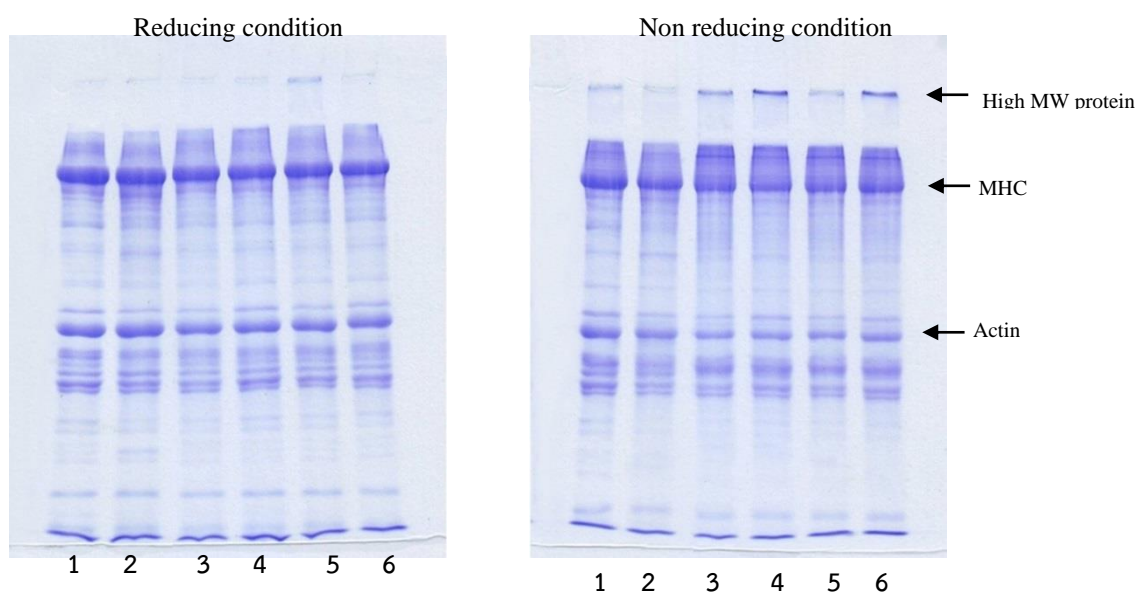
การเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีน (protein patterns) เนื้อปลาเผาสด

รูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของเนื้อปลาเผาสดที่ผ่านการเติมเหล็กที่ปริมาณต่างกันและผ่านการ

แช่แข็งทำละลายเป็นจำนวน 7 รอบแสดงดังภาพที่ 4.1 a และ b จากภาพจะเห็นได้ว่าการรวมตัวกันของโปรตีนเป็นโมเลกุลใหญ่ (ใหญ่กว่า myosin heavy chain, MHC) ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยเหล็ก ซึ่งโปรตีน

โมเลกุลใหญ่ที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการลดลงของความเข้มข้นของแบริน myosin และ actin (ภาพที่ 4.7b) การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ และการรวมตัวกันภายใน และระหว่างสายโพลีเพปไทด์จะส่งผลให้เกิดโปรตีนโมเลกุลใหญ่ขึ้น (Xia et al., 2010) ในทางตรงกันข้ามการที่ไม่มีโปรตีนขนาดใหญ่ และการคงอยู่ของความเข้มข้นของโปรตีน myosin และ actin ในภาพที่ 4.1a ซึ่งมีการเติมสาร reducing agents แสดงให้เห็นว่าโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่เกิดขึ้นเชื่อมต่อกันโดยพันธะไดซัลไฟด์ (ภาพที่ 4.1a) เป็น

ที่สังเกตได้ว่าแบรินโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ในตัวอย่างควบคุม มีความเข้มข้นของแบรินโปรตีนต่ำมาก ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาในเนื้อหมึกกระดอง (cuttlefish muscle) (Thanonkaew et al., 2006) อย่างไรก็ตามไม่พบโปรตีนโมเลกุลเล็กที่เกิดจากการเสื่อมสลายของโปรตีนโมเลกุลใหญ่ในทุกตัวอย่าง ซึ่งการศึกษาของ Thanonkaew และคณะ (2006) ก็ได้ผลเช่นเดียวกันในเนื้อหมึกกระดองระหว่างการแช่แข็งทำลายซ้ำ



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีน (SDS-PAGE protein pattern) ของเนื้อปลาเผาะบดที่เติมเหล็ก (FeCl_2 และ FeCl_3) ในปริมาณ 0 และ 25 ppm ระหว่างแช่เยือกแข็งทำลายซ้ำจำนวน 7 รอบ
หมายเหตุ: 1 คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการแช่แข็งทำลายซ้ำ; 2 คือ ตัวอย่างควบคุม; 3 และ 4 คือตัวอย่างที่เติม FeCl_2 ที่ 5 และ 25 ppm; 5 และ 6 คือตัวอย่างที่เติม FeCl_3 ที่ 5 และ 25 ppm

สรุปผลการวิจัย

การเติมเหล็กในรูป FeCl_2 ที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm ส่งผลให้เกิดการออกซิเดชันของไขมัน (TBARS) และเกิดสีเหลือง (b^* value) ในเนื้อปลาเผาะมากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เติมเหล็กในรูปและความเข้มข้นอื่น ๆ (FeCl_2 5 ppm, FeCl_3 5 และ 25 ppm) นอกจากนี้พบว่าการเกิดออกซิเดชันของไขมันและการเปลี่ยนแปลงสียังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเหล็กที่ใช้ การเกิดออกซิเดชันของไขมันยังส่งผลต่อการสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนระหว่างการแช่เยือกแข็งทำลายซ้ำ อย่างไรก็ตามพบว่าการเติมเหล็กมีผลต่อการออกซิเดชันของโปรตีนเพียงเล็กน้อยแม้เติมในความเข้มข้นสูง (25 ppm) เมื่อเทียบกับการแช่แข็งทำลายซ้ำ การเกิดสีเหลือง

ในเนื้อปลาเผาะบดที่เติมเหล็กแสดงให้เห็นว่าการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อปลาเผาะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อปลา ดังนั้นเพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของเนื้อปลาเผาะระหว่างแช่เยือกแข็ง การศึกษากลไกการเกิดสีเหลือง และวิธีการป้องกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

- ประจักษ์ เจริญรัตน์. 2559. “ปลาเผาะ” สุดยอดปลาน้ำโขง คนนครพนม เลี้ยงส่งตลาดเพื่อนบ้าน สร้างเงินแสนต่อรุ่น. ค้นเมื่อ 29 สิงหาคม 2559, http://www.khaosod.co.th/view_newsonline.php?newsid=1458644059
- Ali, S., N. Rajput, C. Li, W. Zhang, and G. Zhou.

2016. Effect of freeze-thaw cycles on lipid oxidation and myowater in broiler chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 18(1), 35-40.
- Alonso, V., E. Muela, J. Tenas, J.B. Calanche, P. Roncalés, and J.A. Beltrán. 2016. Changes in physicochemical properties and fatty acid composition of pork following long-term frozen storage. *European Food Research and Technology*. 242(12), 2119–2127.
- Benjakul, S., and F. Bauer. 2000. Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze-thaw cycles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(8), 1143–1150.
- Benjakul, S., T.A. Seymour, M.T. Morrissey, and H. AN. 1997. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *Journal of Food science*. 62(4), 729–733.
- Benjakul, S., W. Visessanguan, K. Kijroongrojana, and P. Sriket. 2008. Effect of heating on physical properties and microstructure of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. *International journal of food science & technology*. 43(6), 1066–1072.
- Buege, J.A., and S.D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, 2: 32-34.
- Cheng, J.-H., D.W. Sun, and H. Pu. 2016. Combining the genetic algorithm and successive projection algorithm for the selection of feature wavelengths to evaluate exudative characteristics in frozen-thawed fish muscle. *Food chemistry*. 197, 855–863.
- Dean, R. T., S. Fu, R. Stocker, and M. J. Davies. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemistry Journal*, 324(1), 1-18.
- Jeong, J.-Y., G.-D. Kim, H.-S. Yang, and S.-T. Joo. 2011. Effect of freeze-thaw cycles on physicochemical properties and color stability of beef semimembranosus muscle. *Food Research International*. 44(10), 3222–3228.
- Kingwascharapong, P., and S. Benjakul. 2016. Effect of phosphate and bicarbonate replacers on quality changes of raw and cooked Pacific white shrimp as influenced by the repeated freeze-thawing. *International Journal of Refrigeration*. 67, 345–354.
- Kobayashi, Y., and J.W. Park. 2017. Biochemical and physical characterizations of fish protein isolate and surimi prepared from fresh and frozen whole fish. *LWT-Food Science and Technology*. 77, 200–207.
- Kong, B., Y. Guo, X. Xia, Q. Liu, Y. Li, and H. Chen. 2013. Cryoprotectants reduce protein oxidation and structure deterioration induced by freeze-thaw cycles in common carp (*Cyprinus carpio*) surimi. *Food biophysics*. 8(2), 104–111.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259), 680-685.
- Li, Y., B. Kong, X. Xia, Q. Liu, and P. Li. 2013. Inhibition of frozen storage-induced oxidation and structural changes in myofibril of common carp (*Cyprinus carpio*) surimi by cryoprotectant and hydrolysed whey protein addition. *International Journal of Food Science & Technology*. 48(9), 1916–1923.
- Maqsood, S., S. Benjakul, and A.K. Balange. 2012. Effect of tannic acid and kiam wood extract on lipid oxidation and textural properties of fish emulsion sausages during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 130(2), 408–416.
- Moral, A., J. Morales, C. Ruíz-Capillas, and P. Montero. 2002. Muscle protein solubility of some cephalopods (pota and octopus) during frozen storage. *Journal of the*

- Science of Food and Agriculture. 82(6), 663–668.
- Mousakhani-Ganjeh, A., N. Hamdami, and N. Soltanizadeh. 2015. Impact of high voltage electric field thawing on the quality of frozen tuna fish (*Thunnus albacares*). *Journal of food engineering*. 156, 39–44.
- Ooizumi, T., and Y.L. Xiong. 2004. Biochemical susceptibility of myosin in chicken myofibrils subjected to hydroxyl radical oxidizing systems. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52(13), 4303–4307.
- Pokorny, J. 1981. Browning from lipid-protein interactions. *Progress in food and nutrition science*. 5, 421–428.
- Ruiz-Capillas, C., A. Moral, J. Morales, and P. Montero. 2002. The effect of frozen storage on the functional properties of the muscle of volador (*Illex coindetii*). *Food Chemistry*. 78(2), 149–156.
- Sriket, P., S. Benjakul, W. Visessanguan, and K. Kijroongrojana. 2007. Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. *Food chemistry*. 103(4), 1199–1207.
- Thanonkaew, A., S. Benjakul, W. Visessanguan, and E.A. Decker. 2006. Development of yellow pigmentation in squid (*Loligo peali*) as a result of lipid oxidation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54(3), 956–962.
- Tokur, B., and K. Korkmaz. 2007. The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. *Food chemistry*. 104(2), 754–760.
- Wasowicz, E., A. Gramza, M. Hes, H. H. Jeleń, J. Korczak, and M. Malecka. 2004. Oxidation of lipids in food. *Polish journal of Food and Nutrition Sciences*, 13(54), 87–100.
- Xia, X., B. Kong, Q. Liu, and J. Liu. 2009. Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze–thaw cycles. *Meat science*. 83(2), 239–245.
- Xia, X., B. Kong, Y. Xiong, and Y. Ren. 2010. Decreased gelling and emulsifying properties of myofibrillar protein from repeatedly frozen–thawed porcine longissimus muscle are due to protein denaturation and susceptibility to aggregation. *Meat Science*. 85(3), 481–486.