รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1.ชุดโครงการวิจัย โครงการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์

กิจกรรม รวบรวม พัฒนาสายพันธุ์ สารสำคัญ และผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

กิจกรรมย่อย

3. ชื่อการทดลอง การศึกษาการโคลนยีน การแสดงออกของยีน และการผลิตโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งจากแบคทีเรีย

Cloning, expression and production of *afp*, a gene encoding an antifreeze protein from bacteria.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง

มัทนา ศรีหัตถกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน

นางสาวอรุโณทัย ซาววา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง[1]

นางอุมาพร อุประ[2]

5. บทคัดย่อ

คัดเลือกและเก็บรักษาแบคทีเรียทนเย็นได้ 5 สกุล ได้แก่ *P. putida*(antifreeze protein), *Flavobacterium* sp. (antifreeze protein), *B. thuringiensis*(Neub family protein with antifreeze-like domains), *B. subtilis, Proteobacterium* sp.(typeI antifreeze protein) และ *O. intermedium*(cold shock protein CSPA) สามารถโคลนยีนแบคทีเรียได้ 3 ยีน คือ Neub family protein with antifreeze-like domains จาก *Bacillus cereus* ขนาด 984 nucleotides และ antifreeze glycopeptide AFGP related protein จาก *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* ขนาด 1887 nucleotides และ *afp*III จากปลาน้ำลึก *Macrozoarces americanus* clone15typeIII 1 ยีน ขนาด 267 nucleotides และ *X.*

[1] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2] ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร

campestris ขนาด 8, 30.4 และ 58.3 KDa ตามลำดับ โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ผลิตได้จากการทดลองนี้สามารถลดความเสียหายเนื่องจากการแช่แข็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5 genera of bacteria exhibited cold resistance were screened and kept at -20 °C. They were *Pseudomonas putida*(antifreeze protein), *Flavobacterium* sp. (antifreeze protein), *Bacillus thuringiensis*(Neub family protein with antifreeze-like domains), *B. subtilis, Proteobacterium* sp.(typeI antifreeze protein) and *Ochrobactrum intermedium*(cold shock protein CSPA). Neub family protein with antifreeze-like domains of *Bacillus cereus* (984 nucleotides), antifreeze glycopeptide AFGP related protein of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (1887 nucleotides) and *afp*III of *Macrozoarces americanus* clone15typeIII(267 nucleotides) were cloned into pET100/D-TOPO(invitrogen) and expressed in BL21(DE3) by utilizing 1 mM IPTG. The gene products(AFPs) had a molecular mass of 30.4, 58.3 and 8 KDa respectively. The AFP obtained from this experiment significantly improved freezing injury of longans and carrots.

6. **คำนำ**

ภาวะโลกร้อนได้ส่งผลกระทบอย่างต่อเนื่องในทุกประเทศทั่วโลก มีการคาดการณ์ว่าตั้งแต่ปี2553-2563 อุณหภูมิของโลกจะเพิ่มขึ้น 1.4 - 5.8 °ซ (http://maillist.thai-plastic.com/aticle-v02-issue05-01.html) ทำให้สภาพภูมิประเทศเปลี่ยนแปลงอย่างรุนแรงและบ่อยครั้ง และจะรุนแรงมากขึ้นเรื่อยๆ ได้แก่ ความแห้งแล้งอย่างรุนแรง จนไม่สามารถเพาะปลูกได้ วาตภัย อุทกภัย พายุฝนฟ้าคะนอง แผ่นดินไหว ฯ นอกจากนี้ยังมีการคาดการณ์ว่า อุณหภูมิโลกที่สูงขึ้นจะเป็นเหตุให้ปริมาณผลผลิตเพื่อการบริโภคโดยรวมลดลง และจะไปมีผลต่ออายุการเก็บรักษาผลผลิต ทำให้เสื่อมคุณภาพ เสียรสชาติ เน่าเสีย มีโรคและแมลงเข้าทำลายได้ง่าย การยืดอายุการเก็บรักษาอาจจำเป็นต้องเก็บไว้ในที่เย็น ที่อุณหภูมิต่ำ หรือแช่แข็ง ซึ่งมีข้อจำกัดคือต้องใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสม คือต้องทำให้ผลผลิตแข็งตัวอย่างรวดเร็ว และรักษาอุณหภูมิให้คงที่เสมอ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอาจทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์และไซโตพลาสซึมฉีกขาด ทำให้เสื่อมคุณภาพ (Makarevich *et al*., 2010) นอกจากนี้ ผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด ไม่สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำได้ เช่น มะเขือเทศ สตอเบอรี่ เป็นต้น(Thenmozhi, 2005-2006) แนวทางแก้ไขอาจจะดำเนินการ โดยการเติมโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง(antifreeze protein) ลงไป ตามรายงานผลงานทางวิชาการ พบว่าโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งปริมาณน้อย(น้อยกว่า 1 μg/ml)สามารถต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งในไอศกรีมได้(Makarevich *et al*., 2010; Thenmozhi, 2005-2006; http://findarticles. com/p/articles/mi_m3289/is_6_169/ ai_63845999/) หรือจากรายงานของ Payne *et al*.(1994) พบว่าเมื่อมีการนำเนื้อวัวไปจุ่มใน AFGP หรือ AFP ความเข้มข้น 1 มก./มล. ก่อนนำไปแช่แข็งที่ -20 °C จะทำให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดเล็กลง นอกจากนั้นการฉีด AFGP จากปลากคอดจากทวีปแอนตาร์กติกาในแกะก่อนการฆ่าช่วยลด drip loss และลดขนาดน้ำแข็งในแกะที่เก็บไว้ที่ -20 °C เป็นเวลา 2-16

สัปดาห์ และผลึกน้ำแข็งจะเล็กที่สุด ถ้าฉีดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.01 μg/kg AFGP โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากฉีด 24 ชั่วโมงก่อนการฆ่าแกะ

โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง(antifreeze protein) เป็น polypeptide ผลิตโดยสัตว์มีกระดูกสันหลัง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง(ได้แก่ แมลงและหนอน) พืช รา และแบคทีเรีย ที่อาศัยอยู่ในเขตหนาว ที่มีหิมะปกคลุมอยู่เป็นเวลานาน มีลักษณะโครงสร้างเป็น 2 กลุ่มคือ antifreeze glycoprotein(AFGP) มี carbohydrate moieties ในโครงสร้าง และ antifreeze protein(AFP) ไม่มี carbohydrate moieties ในโครงสร้าง มีคุณสมบัติในการต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยการไปจับบนผิวหน้าของผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก แล้วต้านการโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งและการเกิดผลึกน้ำแข็งใหม่(recrystalization) และลดอุณหภูมิของจุดเยือกแข็งของอาหาร ที่ปริมาณความเข้มข้นเจือจาง(http://ounqpi.org/scientist-explores-afps; http://en.wikipedia.org/wiki/ Atifreeze_protein) จากคุณสมบัตินี้ ทำให้โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง ต่างจากสารต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งอื่นๆ เช่น ethylene glycol ที่ลด freezing point ตามความเข้มข้นของสารที่ใช้ ถ้าใช้มาก ลดมาก และถ้าใช้น้อย ลดน้อย ปัจจุบันนักวิจัยในต่างประเทศได้ให้ความสนใจศึกษากลไกการทำงานของโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง และการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและทางการแพทย์มากยิ่งขึ้น เพื่อป้องกันพืชผลจากพายุหิมะและป้องกันอวัยวะที่ใช้ในการปลูกถ่ายอวัยวะทางการแพทย์ และการเก็บรักษาเม็ดเลือดแดง แต่ผลการทดลองยังไม่เป็นที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามได้มีการใช้โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งในผลิตภัณฑ์ เช่น ไอศกรีม โยเกิร์ต เบเกอรี่ และในเครื่องสำอางเพื่อป้องกันผิวจากความเย็น(http://findarticles.com/p/articles/mi_m3289/is_6_169/ai_63845999/; http://ounqpiorg/scientist-explores-afps; http://www.dailynew.co.th; http://www.en.wikipedia.org/wiki/Antifreezeprotein; United State Patent 6914043; Chattopadhyay, 2007; Makarevich *et al*., 2010) นอกจากนี้ยังได้มีการค้นหาโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเดิม เพื่อใช้ในวงการเกษตร อุตสาหกรรมอาหาร แพทย์ และเทคโนโลยีชีวภาพ จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียที่เก็บไว้ในตู้เย็น -20°ซ เป็นเวลา 1-2 ปี ในสภาพที่มีอาหารน้อยมากในหลอดทดลอง ยังคงมีชีวิตอยู่ และสามารถเจริญได้ปกติเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร จึงเป็นไปได้ที่แบคทีเรียเหล่านี้ จะสร้างโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง เพื่อคงความมีชีวิต หากได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตทางการเกษตรทั้งในและนอกฤดูปลูก อุตสาหกรรมอาหาร เทคโนโลยีชีวภาพของประเทศไทยในอนาคตได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการโคลนยีน การแสดงออกของยีน ต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งจากแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาการผลิตโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยเทคโนโลยีชีวภาพ
3. เพื่อศึกษาการนำไปใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตทางการเกษตรในสภาพเย็นจัด ทั้งในและนอกฤดูปลูก และในอุตสาหกรรมอื่นๆ ต่อไป

7.วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. hot start high-fidelity DNA polymerase
2. primer
3. restriction enzyme
4. expression vector
5. expression host(*E. coli* BL21 (DE3)
6. IPTG
7. benzamidine
8. sodium azide
9. ammonium sulfate
10. potassium phosphate buffer
11. LB
12. PMSF 0.2 mM
13. DEAE-cellulose chromatography
14. Calcoflour white M2R
15. congro red
16. 30 % acylamide/ 0.8 % bisacrylamide gel
17. ammonium persulfate
18. TEMED
19. butanol
20. Coomassie Blue R-250
21. lysozyme
22. lactose
23. sodium acetate
24. Amplicilin
25. dialysis bag
26. citric acid
27. glacial acetic acid
28. hydrochloric acid
29. potassium tetraborate
30. dibasic sodium phosphate

31. McIlvaine buffer
32. sonicator
33. kinetic spectrophotometer
34. อื่นๆ

วิธีการ

งานวิจัยนี้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน

1. การคัดเลือกแบคทีเรีย

แบบและวิธีการทดลอง ไม่มีแบบการทดลอง เนื่องจากไม่ได้มีการเปรียบเทียบ

นำแบคทีเรียที่เก็บไว้ในหลอดทดลองในตู้ -20°ซ เป็นเวลา 1-2 ปี มาเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar ที่ 37 °ซ คัดเลือกแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่มาโคลนยีนโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง(*afp*) ในระยะแรกจะโคลนยีน *afp* จากแบคทีเรียที่มีรายงานผลการศึกษาวิจัยแล้ว 5 เชื้อ ได้แก่ *Pseudomonas putida*(antifreeze protein), *Flavobacterium* sp.(antifreeze protein), *Bacillus thuringiensis* (Neub family protein with antifreeze-like domains), *Proteobacterium* sp. (typeI antifreeze protein) และ *Ochrobactrum intermedium* (cold shock protein CSPA)

2. การโคลนยีน *afp* จากแบคทีเรีย

วิธีการ

1. สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่แยกเก็บไว้ โดยวิธี SDS DNA extraction method
2. ออกแบบ primer จากลำดับเบสที่มีอยู่ในยีนแบงค์
3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งของยีน *afp* โดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่ได้ออกแบบไว้
4. purify PCR product โดยใช้ NucleoSpin Gel and PCR Clean-up(Macherey-Nagel) มีวิธีการตามคู่มือที่แนบมากับชุด kit
5. โคลนดีเอ็นเอของยีน *afp* เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ตามวิธีการที่ได้แสดงไว้ใน Champion pET Directional TOPO Expression Kits (Invitrogen)
6. ตรวจสอบยีนที่โคลนได้ โดยการใช้ปลายทิปขนาดเล็ก แตะลงบนโคโลนีสีขาว นำไปผสมกับ PCR component จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง T7 และ T7 promoter ด้วยเครื่อง Gene Amp PCR System 9700 Thermocycler
7. ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ โดยวิธี electrophoresis ใน agarose gel 1 % 0.5 TBE 100 Volt 50 Amp. ใช้ 3 kb DNA ladder เป็น marker
8. สกัดพลาสมิด โดยใช้ชุด kit NucleoSpin Plasmid Quick Pure(Macherey-Nagel)
9. ส่งพลาสมิดไปหาลำดับเบสโดยเครื่องอัตโนมัติ และตรวจสอบ homologyโดยใช้โปรแกรม Blastn

3. การโคลนยีน AFP typeIII จากปลาน้ำลึก Macrozoarces americanus

Macrozoarces americanus clone 15 type III antifreeze protein (AFPIII) mRNA, complete cds

หัวหน้าการทดลอง

อรุโณทัย ซาววา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลของยีน AFP typeIII ของปลาน้ำลึก Macrozoarces americanus ใน Genbank
2. แปลงเบสให้เหมาะสมต่อการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*
3. จ้างสังเคราะห์ยีน และเชื่อมต่อยีนเข้าไปในเวคเตอร์
4. โคลนยีนตามวิธีการในคู่มือ invitrogen TOPO Expression kit

3. การศึกษาการเหนี่ยวนำให้ recombinant *E. coli* BL21 ผลิตโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง(AFP) และการทำให้โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง บริสุทธิ์

การเหนี่ยวนำให้ recombinant *E. coli* BL21 ผลิต AFP และการทำให้ AFP บริสุทธิ์ดำเนินการตามวิธีการในคู่มือ invitrogen TOPO Expression kit และ Invitrogen Ni-NTA Purification System ดังนี้

3.1 transforming BL21 star(DE3) โดยการใส่ 5-10 ng *afp* inserted plasmid DNA ลงไปใน BL21 star(DE3) cell ดำเนินตามขั้นตอนจนได้ recombinant *E. coli* BL21(DE3) จากนั้นเลี้ยง recombinant *E. coli* BL21(DE3) ที่ได้รับยีน *afp* ในอาหารเหลว LB ผสม Ampicillin 50-100 µg/ml บนเครื่องเขย่า ที่ 30 °ซ จนมีค่า OD_{600nm}= 0.5-0.8 กระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนโดยการใส่ 1 mM IPTG(แบ่งใส่ 2 ครั้ง) เก็บเกี่ยวเซลล์ทุกชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบ/นาที 1 นาที ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ ใน lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10 mM β-merceptoethanol, and 1 mM PMSF) และทำให้เซลล์แตกโดย sonicator หรือ lyzozyme นำส่วนใสไปตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดย SDS-PAGE.

3.2 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ ดำเนินการตามวิธีการที่แสดงไว้ในคู่มือ Probond Purification System (Invitrogen) ดยการเติมส่วนใสที่สกัดไว้ลงใน Ni-NTA Purification column เขย่าเบาๆให้โปรตีนเกาะติดกับเรซิน 30-60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 800 xg แล้วดูดส่วนใสเก็บไว้ที่ 0 °ซ จากนั้น wash ด้วย native wash buffer 8 มล. 3 ครั้ง ดูดส่วนใสแต่ละ wash เก็บไว้ที่ 0 °ซ และชะโปรตีน (elute) ด้วย native elution buffer 8-12 มล. เก็บส่วนใสทุกๆ 1 มล. เก็บไว้ที่ 0 °ซ นำส่วนใสทั้งหมดไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดย SDS-PAGE เก็บโปรตีนที่บริสุทธิ์ที่ -20°ซ วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

4. การทดสอบประสิทธิภาพของ AFP ในการเก็บรักษาผลผลิตทางการเกษตร

หัวหน้าการทดลอง

อุมาพร อุประ[2]

ผู้ร่วมงาน

มัทนา ศรีหัตถกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

วิธีดำเนินการ

ดำเนินการโดยวิธี osmotic dehydration และ hydroponic

osmotic dehydration เป็นวิธีการลดปริมาณน้ำที่มีอยู่ในตัวอย่างพืชและอาหารก่อนนำไปแช่แข็ง โดยการแช่ผลิตผลเกษตรลงในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง เช่น สารละลายน้ำตาลซูโครส สารละลายเกลือ เป็นต้น เป็นวิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ผักและผลไม้มีองค์ประกอบของน้ำจำนวนมากกว่าเนื้อสัตว์ และโครงสร้างของผนังเซลล์ (Cell Wall) มีความยืดหยุ่นน้อยกว่าเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane) จึงเสียหายจากผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ได้ง่ายกว่า แม้ว่าจะเพิ่มอัตราการแช่แข็งให้เร็วขึ้นเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ แต่ก็ไม่สามารถหลีกเลี่ยงความเสียหายได้ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำในเซลล์มีมาก การลดปริมาณน้ำจึงช่วยลดขนาดของผลึกน้ำแข็ง และถ้าหากได้มีการใช้สารละลาย AFP ร่วมด้วย เมื่อนำไปแช่เยือกแข็ง น่าจะช่วยลดขนาดผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นได้อีกทางหนึ่ง

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 ลำไยสด พันธุ์อีดอ

1.2 แครอทสดออสเตรเลีย

2. อุปกรณ์

2.1 บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร (PYREX, USA)

2.2 ถาดอะลูมิเนียม (aluminum tray)

2.3 ช้อนสแตนเลส

2.4 ถุงซิปลอค

2.5 กล่องพลาสติกใส่อาหาร

2.6 กระบอกฉีดน้ำ

2.7 กระดาษทิชชู่

2.8 ตะกร้าพลาสติก

2.9 กระบอกตวง (cylinder) 1,000 ml. (Witeg, Germany)

2.10 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 ml. (DURAN, Germany)

2.11 นาฬิกาจับเวลา (stopwatch)

2.12 ขวดน้ำกลั่น (wash bottle)

2.14 เครื่องวัดสี (Konica Minolta, CR-400, Japan)

2.15 เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัสอาหาร (Texture Analyzer, TA-XT plus, UK)

3. สารเคมี

3.1 น้ำตาลทรายยี่ห้อมิตรผล

3.2 Anti-Freeze Protein (AFP)

3.3 สารเคลือบเนื้อบริโภคได้

3.4 สารเคลือบผิวผลไม้

3.5 Sodium chloride (NaCl) (RCI Labscan, Thailand)

วิธีการ

1.Osmotic Dehydration

นำลำไยทั้งเปลือก และแครอททั้งหัว มาแช่ในสารละลายซูโครส ร้อยละ 55 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (แครอทล้างด้วย NaCl ร้อยละ 0.9 เป็นเวลา 2 วินาที) หลังจากแช่สารละลายซูโครสเสร็จนำออกมาพักทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก และแช่ในสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้น 1.2, 10 และ 50 ppm. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกมาวางทิ้งไว้อีก 1 ชั่วโมง เพื่อ equilibrate สารละลายภายในเซลล์ และให้เวลาAFP ได้เข้าไปทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ ทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เสร็จแล้วทำการพ่นสารเคลือบผิวผลไม้ลงบนตัวอย่างจนทั่ว ก่อนนำตัวอย่างใส่ถุงซิปล็อค และนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ผล

1.1 อัตราการไหลออกของน้ำ และการซึมเข้าของโปรตีน

ทำการชั่งน้ำหนักของตัวอย่างก่อนแช่ และหลังแช่สารละลายซูโครสและโปรตีน แล้วนำมาคำนวณอัตราการไหลออกของน้ำจากวัตถุดิบ และอัตราการซึมเข้าของสารละลายโปรตีน ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเพิ่มหรือลด} = \frac{\text{น้ำหนัก หลังแช่} - \text{น้ำหนักก่อนแช่} \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนแช่}}$$

1.2 ค่าสี (colour value)

ในการวิเคราะห์ค่าสีด้วยเครื่องวัดสี(Konica Minolta รุ่น CR-400, Japan) ที่ Illuminant D65 จะต้องทำการอุ่นเครื่องก่อนเป็นเวลา 30 นาที ปรับมาตรฐานเครื่องวัดสีด้วย standard white plate ก่อนการวัดค่าสีของตัวอย่าง ซึ่งการวัดค่าสีระบบ CIE ประกอบด้วยค่า

L* หมายถึง ค่าความสว่างของสี ซึ่งมีค่าจาก 0 คือสีดำ ถึง 100 คือสีขาว

a* หมายถึง ค่าความเป็นสีเขียวและสีแดง เมื่อ a* มีค่าบวก จะแสดงถึงความเป็นสีแดง และเมื่อ a* มีค่าลบ จะแสดงถึงความเป็นสีเขียว

b* หมายถึง ค่าความเป็นสีน้ำเงินและสีเหลือง เมื่อ b* มีค่าบวก จะแสดงถึงความเป็นสีเหลือง และเมื่อ b* มีค่าลบ จะแสดงถึงความเป็นสีน้ำเงิน

1.3 Drip loss

Drip loss หมายถึง การสูญเสียของเหลว จากการแช่เยือกแข็ง (freezing) เมื่อนำมาหลอมละลายตัวอย่างที่ผ่านการแช่เยือกแข็งอย่างช้าๆ หรือมีอัตราการแช่เยือกแข็ง (freezing rate) ต่ำ ทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ มีผลให้เกิดการทำลายเซลล์อาหาร เมื่อนำอาหารแช่เยือกแข็งมาหลอมละลาย จะทำให้อาหารสูญเสียน้ำและของแข็งที่ละลายในน้ำ อาหารจึงสูญเสียคุณภาพด้านต่างๆ เช่น เนื้อสัมผัส รสชาติ และคุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งการหาการสูญเสียของเหลว จะหาได้จาก

$$\% \text{ Drip loss} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนการแช่แข็ง} - \text{น้ำหนักหลังการแช่แข็ง} \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนการแช่แข็ง}}$$

1.4 ความแน่นเนื้อ

ตรวจวัดโดยใช้เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัสอาหาร (Texture Analyzer)

เตรียมตัวอย่าง โดยใช้แครอททั้งหัวที่ผ่านการละลายน้ำแข็ง เปรียบเทียบกับตัวอย่างชุดควบคุม (ไม่ผ่านการแช่โปรตีน AFP) นำไปวัดความแน่นเนื้อด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัสอาหาร (Texture Analyzer, TA-XT plus, UK) ด้วยหัวเจาะทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร (P/2N) โดยแต่ละหัวจะวัด 3 จุด ได้แก่ ส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนท้ายของแครอททั้งหัว แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย สำหรับตัวอย่างลำไยจะนำมาแกะเฉพาะเนื้อนำไปวัดหาค่าความแน่นเนื้อ ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็นนิวตัน (N)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ AFP ในการเก็บรักษาผลผลิตทางการเกษตรโดยการวิธี hydroponics

อุปกรณ์

1.ผักกะเฉดทั้งต้น

2.ผักชีฝรั่งทั้งต้น

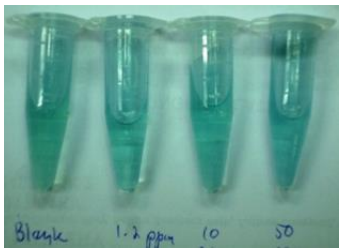
3.ต้นหอมทั้งต้น

4.ตั้งโอ๋ทั้งต้น

5.ผักบุ้งทั้งต้น

6.สารเคลือบผิวผลไม้ผสมไคโตซาน ได้รับการอนุเคราะห์ผลิตภัณฑ์จาก ดร.อภิตา บุญศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

7.น้ำโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งของ X. *campestris* pv. *campestris* 1.2, 10, 20 และ 50 พีพีเอ็มละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์(de-ionized water)



ความเข้มข้นของน้ำโปรตีน 0(blank), 1.2, 10 และ 50 พีพีเอ็ม(มก./ล.) วัดโดยวิธี Bradford method

วิธีการ

1. ล้างผักที่จะใช้ทดสอบให้สะอาดในน้ำไหล
2. ผึ่งแห้งที่อุณหภูมิห้อง 28-32 °ซ จนผักเริ่มแสดงอาการเหี่ยว
3. จุ่มรากของผักลงในน้ำโปรตีนความเข้มข้น 0, 1.2, 10 และ 50 พีพีเอ็ม จนผักแสดงอาการสด นาน 3 -4 ชม.
4. เคลือบผักทั้งต้นด้วยสารเคลือบผักผลไม้ผสมไคโตซานผลิตภัณฑ์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
5. ห่อด้วยกระดาษใส่ถุงพลาสติครัดปากถุง นำไปเก็บไว้ที่ -20 เป็นเวลา 3 วัน
6. นำออกมาไว้ที่ 0 °ซ, 4 °ซ และอุณหภูมิห้อง ตามลำดับเพื่อค่อยๆละลายน้ำแข็งอย่างช้าๆ
7. **Control** มี 2 ลักษณะ 1. แช่ในน้ำเปล่า และ 2. แช่ในซูโครส 55 **%**

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เวลาและสถานที่ ต.ค. 2556 สิ้นสุด ต.ค. 2558 รวม 3 ปี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. คัดเลือกแบคทีเรียทนเย็น

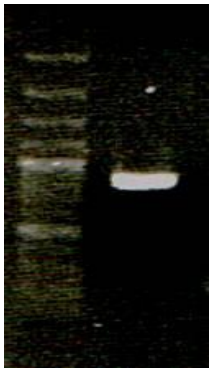
ได้แบคทีเรียทนเย็น 5 สกุล ได้แก่

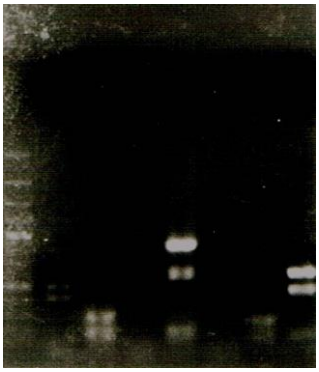
1. *Pseudomonas putida*(antifreeze protein)
2. *Flavobacterium* sp. (antifreeze protein)
3. *Bacillus thuringiensis*(Neub family protein with antifreeze-like domains)
4. *B. subtilis*
5. *Proteobacterium* sp.(typeI antifreeze protein)
6. *Ochrobactrum intermedium*(cold shock protein CSPA)

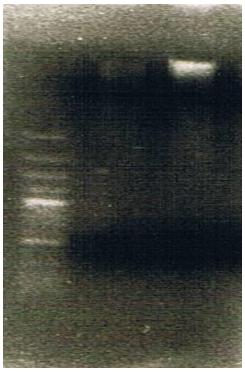
2. การโคลนยีน *afp*

โคลนยีนแบคทีเรียได้ 2 ยีน คือ

1.Neub family protein with antifreeze-like domains จาก *Bacillus cereus* ขนาด 984 nucleotides

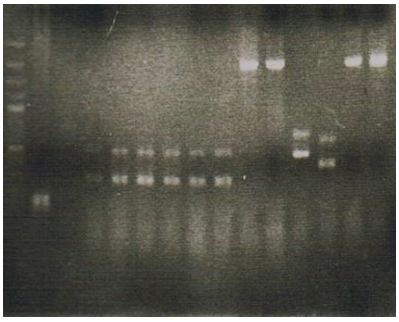


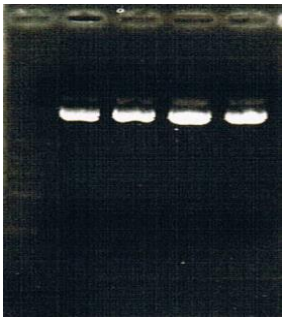




PCR AFP *B. cereus* 984 bp. Pick colony AFP *B. cereus*(lane 5) plasmid AFP *B. cereus*

2.antifreeze glycopeptide AFGP related protein จาก *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* ขนาด 1887 nucleotides





Pick colony AFP *X. campestris* (lane 10,111,14 และ15) plasmid AFP *X. campestris*

และโคลนยีน *afp* จากปลาน้ำลึก 1 ยีน ขนาด 267 nucleotides

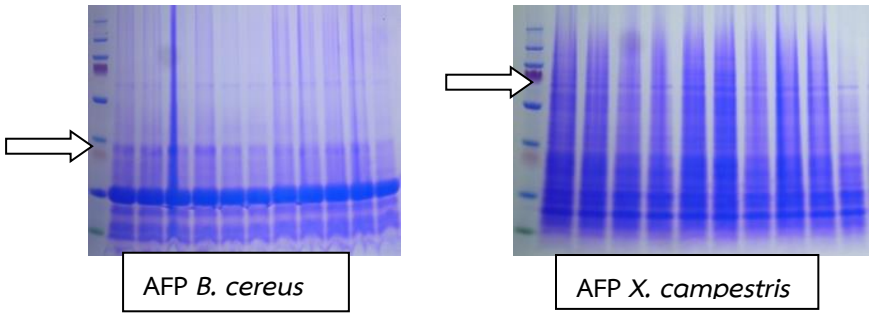
```
Translate to BL21 = 267 bp

atgaaaagcgtgattctgaccggcctgctgtttgtgctgctgtgcgtggatca
tatgagcagcgcgaaccaggaaagcgtggtggcgacccagctgattccgatta
acaccgcgctgaccctggtgatgatgaccacccgcgtgatttatccgaccggc
attccggcggaagatattccgcgcctggtgagcatgcaggtgaaccaggcggt
gccgatgggcaccaccctgctgccggatatggtgaaaggctatccgctgacct
ag
```

```
MKSVILTGLLFVLLCVDHMSSANQESVVATQLIPINTALTLVMMTTRVIYPTG
IPAEDIPRLVSMQVNQAVPMGTTLLPDMVKGYPLT
```

โปรตีน AFP typeIII ของปลาขนาด ประมาณ 8 KDa

3. การศึกษาการเหนี่ยวนำให้ recombinant *E. coli* BL21 ผลิตโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง(AFP) และการทำให้โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งบริสุทธิ์

สามารถเหนี่ยวนำให้ recombinant *E. coli* BL21 ผลิตโปรตีน AFP ได้โปรตีนของปลา, *B. cereus* และ *X. campestris* ขนาด 8, 30.4 และ 58.3 KDa ตามลำดับ



AFP ของปลามีขนาดเล็กมาก 8 KDa มักสูญหายไปในขั้นตอนการตกตะกอน และมักจะปนอยู่กับพวกสิ่งสกปรกด้านล่างของเจล แยกออกได้ยาก ดังนั้นจึงศึกษาโปรตีนของ AFP *B. cereus* และ AFP *X. campestris* ก่อน

การทำให้ AFP บริสุทธิ์ สามารถทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน เนื่องจากโปรตีนเกาะเรซินน้อย และมักหลุดออกไปในขั้นตอนการล้าง ทำให้ได้โปรตีนน้อย

4. การทดสอบประสิทธิภาพของ AFP ในการเก็บรักษาผลผลิตทางการเกษตร

1. Osmotic Dehydration

1.1 อัตราการไหลออกของน้ำ และการซึมเข้าของโปรตีน

พบว่า ตัวอย่างลำไยและแครอทที่แช่ในน้ำตาลซูโคลสร้อยละ 55 นาน 3 ชม. มีร้อยละของน้ำไหลออกจากเซลล์ เฉลี่ย 0.3 และ 8.9 ตามลำดับ(ตารางที่1) ส่วนร้อยละของการซึมเข้าของน้ำโปรตีน AFP ของตัวอย่างลำไยและแครอท ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$; ตารางที่ 1) โดยพบว่า ในตัวอย่างของลำไย มีร้อยละของการซึมเข้าของน้ำโปรตีน AFP 0.94-1.10 และแครอทมีร้อยละของการซึมเข้าของโปรตีนที่ร้อยละ 7.75-8.04 ในทางทฤษฎีของงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำเป็นต้องลดปริมาณน้ำในเซลล์พืชให้เหลือเพียงร้อยละ 20-30 ผลจากการทดลองนี้ลดปริมาณน้ำในเซลล์พืชได้น้อยมาก การลดปริมาณน้ำในเซลล์พืช เป็นปัญหาสำคัญของการทดลองนี้ ก่อนทำการทดลองนี้ ได้ทำการศึกษาการลดปริมาณน้ำโดยวิธี vacuum dehydrofreezing พบว่า สามารถลดปริมาณน้ำในลำไยได้ 1.91 ก./ชม.และ 2.33 ก./ชม. ในแครอท แต่มีปัญหาตามมาคือ ทำให้ผิวเปลือกลำไยและแครอทแตก และใช้เวลานานมากว่า 1 ชม. ไม่เป็นไปตามวิธีการที่มีรายงานไว้ในวารสารทางวิชาการที่สามารถลดปริมาณน้ำได้ภายในระยะเวลาสั้น การใช้วิธี air blast ก็ไม่ประสบผลสำเร็จ จึงเลือกใช้วิธี osmotic dehydration ซึ่งง่าย สะดวกและประหยัดกว่า

ตารางที่ 1 ร้อยละการไหลออกของน้ำ และร้อยละการซึมข้าวของโปรตีนเข้าไปในเซลล์พืช

ระดับความเข้มข้นของโปรตีน (ppm)	อัตราการไหลออกของน้ำ (ร้อยละ)		การซึมเข้าของโปรตีน (ร้อยละ)	
	ลำไย^{ns}	แครอท^{ns}	ลำไย^{ns}	แครอท^{ns}
1.2	0.24 ± 0.14	8.37 ± 0.69	1.04 ± 0.14	7.75 ± 1.10
10	0.45 ± 0.50	9.26 ± 1.53	1.10 ± 0.57	7.61 ± 0.46
50	0.29 ± 0.08	8.96 ± 0.76	0.94 ± 0.14	8.04 ± 0.48
เฉลี่ย	0.3	8.9	1.03	7.8

หมายเหตุ - ค่าของข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ตัวอักษรยกขึ้น ^{ns} แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

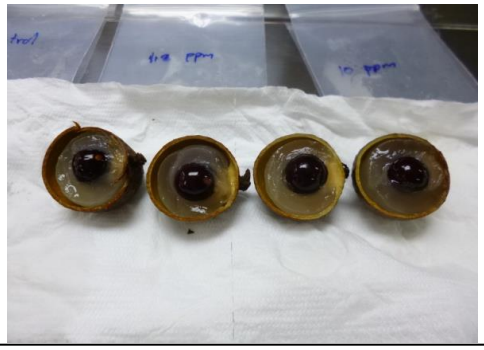
1.2 **ค่าสี (colour value)**

ภายหลังการแช่แข็ง และการละลายของน้ำแข็ง เมื่อมองด้วยตาเปล่า ค่าสีของลำไยและแครอท ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน (ppm)ต่างๆ ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2 และ 3) ค่าสีของ control จะคล้ำมากกว่าตัวอย่างที่ผ่านการแช่ AFP

แครอทก่อนดำเนินการทดลอง

ตัวอย่างแครอทในวันที่3 ภายหลังการละลายน้ำแข็ง (control, AFP1.2,10,20 และ50 ppm. ตามลำดับ

ลำไยพันธุ์อีดอ ตัวอย่างสด



ตัวอย่างลำไยหลังการละลายน้ำแข็งวันที่3(control, AFP1.2, 10,และ 50 ppm ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่าสีของตัวอย่างก่อนและหลังการแช่แข็งของลำไย

ระดับความเข้มข้นของโปรตีน (ppm)	วันที่ 0			วันที่ 3		
	L*^{ns}	a*^{ns}	b*	L*^{ns}	a*^{ns}	b*
control	26.70 ± 0.18	0.98 ± 0.32	-0.46 ± 0.09^{b}	30.71 ± 2.20	0.61 ± 0.61	-0.77 ± 0.84
1.2	27.66 ± 0.55	1.39 ± 0.24	0.60 ± 0.16^{a}	31.64 ± 0.79	0.63 ± 0.60	-0.71 ± 0.60
10	27.80 ± 1.90	1.54 ± 0.59	0.36 ± 0.33^{a}	31.72 ± 1.62	0.70 ± 0.10	-1.42 ± 0.10
50	25.86 ± 0.61	1.58 ± 0.13	-0.03 ± 0.67^{ab}	30.57 ± 3.47	0.85 ± 0.94	-1.10 ± 0.94

หมายเหตุ

- ค่าของข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- ^{abc} แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p มากกว่า0.05)
- ^{ns} แสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

1.3 Drip loss

ในตัวอย่างของลำไยที่ไม่ผ่านการแช่โปรตีน(Control) จะมีการสูญเสียของเหลวมากกว่าตัวอย่างที่ผ่านการแช่โปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P มากกว่า0.05) ส่วนในตัวอย่างแครอท จะพบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 1.2 ppm และ10 ppm จะมีค่าร้อยละการสูญเสียของเหลวหลังจากการแช่แข็ง น้อยที่สุดคือ 6.65 และ 6.88 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่า AFP มีผลยับยั้งการเกิด drip loss อย่างเด่นชัด

ตารางที่ 4 ร้อยละการสูญเสียของเหลวหลังการแช่แข็งของตัวอย่าง

ระดับความเข้มข้นของโปรตีน (ppm)	Drip loss (ร้อยละ)	
	ลำไย	แครอท
Control (non-treated AFP)	11.19 ± 0.82^{b}	8.68 ± 1.00^{a}
1.2	8.81 ± 1.14^{a}	6.65 ± 0.18^{b}
10	8.09 ± 0.49^{a}	6.88 ± 0.62^{b}
50	7.32 ± 1.43^{a}	7.65 ± 1.32^{ab}

ตัวอย่างแครอทในวันที่ 0 (control, AFP 1.2, 10 และ 50 ppm. ตามลำดับ)

ตัวอย่างแครอทในวันที่ 3 หลังการละลายน้ำแข็ง (control, AFP 1.2, 10 และ 50 ppm. ตามลำดับ)

1.4 การวัดความแน่นเนื้อด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัสอาหาร (Texture Analyzer)

ความแน่นเนื้อในตัวอย่างลำไยที่ผ่านการแช่โปรตีนทั้ง 3 ระดับจะให้ความแน่นเนื้อที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่มีค่ามากกว่าตัวอย่าง Control ซึ่งความแน่นเนื้อจะมีค่าลดลง เนื่องจากเกิดการสูญเสียน้ำ เซลล์แตก ตัวอย่างแครอท ที่ความเข้มข้นโปรตีน 1.2 ppm มีความแน่นเนื้อสูงที่สุด คือ 10.35 นิวตัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความแน่นเนื้อของลำไยและแครอท

ระดับความเข้มข้นของโปรตีน (ppm)	ความแน่นเนื้อ (N)	
	ลำไย	แครอท
Control (non-treat AFP)	28.89 ± 1.94^{b}	7.50 ± 1.44^{b}
1.2	42.48 ± 6.71^{a}	10.35 ± 0.65^{a}
10	39.57 ± 3.58^{a}	8.97 ± 1.41^{ab}
50	39.79 ± 6.44^{a}	9.41 ± 1.74^{ab}

ตัวอย่างแครอทที่แช่สารละลายซูโครสที่ความเข้มข้น ร้อยละ 55

แครอทหลังการแช่สารละลายซูโครส นำมาแช่สารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้น 1.2, 10 และ 50 ppm.

บรรจุแครอทลงถุงซิปล็อคก่อนทำการแช่แข็ง

ลำไยสดทั้งเปลือกแช่สารละลายซูโครส ที่ร้อยละ 55

ลำไยหลังการแช่สารละลายซูโครส นำมาแช่สารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้น 1.2, 10 และ 50 ppm.

บรรจุลำไยลงถุงซิปลอคก่อนนำไปแช่แข็ง

นำลำไยไปแช่แข็งที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.hydroponic

ก่อนนำไปแช่แข็งที่ -20 **°ซ** Control(1. แช่ในน้ำเปล่า และ 2. แช่ในซูโครส 55 %) และผักที่ได้รับซูโครส 55 %+โปรตีน AFP ระดับต่างๆ แสดงอาการปกติ แต่ภายหลังการละลายน้ำแข็ง ผักแสดงอาการฉ่ำน้ำ

และ ทั้งนี้น่าจะมีสาเหตุมาจาก กรรมวิธีในการละลายน้ำแข็งไม่ถูกต้อง การทำให้น้ำแข็งค่อยๆละลายที่อุณหภูมิ 0 และ 4 **°ซ** จะไปทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ ทำให้เซลล์ฉีกขาด ยังไม่ได้ทดลองทำให้ละลายที่ 55 **°ซ** หรือสูงกว่าตามวิธีการของสาขาวิชาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากผักที่ซื้อมาจากตลาดน่าจะไม่ค่อยแข็งแรง

วิธีการ **hydroponic**

Control : ซูโครส 55 % 2 h. แล้วเคลือบผิวด้วยสารเคลือบผิวผลไม้

Treatment : ซูโครส 55 % + AFP 1.2, 10 และ 50 ppm. 2 h. ตามลำดับ แล้วเคลือบผิวด้วยสารเคลือบผิวผลไม้

ผักแสดงอาการฉ่ำน้ำ และ

ผลการทดลองนี้แสดงชัดเจนว่า โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ สามารถลดความเสียหายเนื่องจากการแช่แข็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กรรมวิธีและความเข้มข้นของโปรตีนและน้ำตาลที่ใช้ จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนให้เหมาะสม ที่สำคัญคือ การละลายน้ำแข็ง จำเป็นต้องใช้เทคนิคทางสาขาวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือทำให้ละลายที่ความร้อนสูงอย่างรวดเร็ว เพื่อทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดเล็กลง

การแช่แข็ง เป็นกรรมวิธีการลดอุณหภูมิของอาหาร ให้ต่ำลงกว่าจุดเยือกแข็ง โดยส่วนของน้ำจะเปลี่ยนสภาพไปเป็นผลึกน้ำแข็ง ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ของอาหารจะลดลง เนื่องจากสารละลายในน้ำที่ยังไม่แข็งตัว มีความเข้มข้นสูงขึ้น ผลกระทบของการแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพอาหารคือ เกิดความเสียหายต่อเซลล์ เนื่องจากผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ จะไปทำให้เซลล์ฉีกขาด เซลล์พืชและสัตว์มีความทนทานต่อความเสียหายจากการแช่แข็งต่างกัน เนื้อสัตว์มีโครงสร้างเส้นใยที่ยืดหยุ่นกว่าเซลล์พืช จึงทนทานต่อการแช่แข็งมากกว่าพืช เนื้อสัมผัสจึงไม่เกิดการเสียหายรุนแรง ส่วนผักและผลไม้จะได้รับความเสียหายจากผลึกน้ำแข็งมากกว่า เนื่องจากโครงสร้างเซลล์ที่ยืดหยุ่นน้อยกว่า ขนาดความเสียหายขึ้นกับขนาดของผลึกน้ำแข็ง และอัตราการถ่ายเทความร้อน ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์มาก ได้แก่ ชนิดและคุณภาพของวัตถุดิบ วิธีการจัดการก่อนการแช่แข็ง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากวิธีแช่แข็ง การเก็บรักษาระหว่างการแช่แข็งและวิธีละลายน้ำแข็ง

การแช่แข็งอย่างช้าๆ จะทำให้ผลึกน้ำแข็งในช่องว่างระหว่างเซลล์โตขึ้น ผลึกน้ำแข็งมีความดันไอน้ำต่ำกว่าภายในเซลล์ น้ำจากเซลล์จึงเคลื่อนที่ไปยังผลึกน้ำแข็ง ทำให้ผลึกน้ำแข็งโตใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ และทำให้เซลล์สูญเสียน้ำและได้รับความเสียหายต่อไป เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์สูงขึ้น เซลล์จะไม่กลับมามีรูปร่างและความแข็งแรงเหมือนเดิม เมื่อน้ำแข็งในอาหารนี้ละลาย อาหารจะนิ่มและสารต่างๆภายในเซลล์ จะไหลออกมา ทำให้เซลล์เสียหายหรือที่เรียกว่า น้ำไหลซึม (Drip) ส่วนการแช่แข็งอย่างรวดเร็ว ผลึกน้ำแข็งทั้งในเซลล์และในช่องว่างระหว่างเซลล์จะมีขนาดเล็ก จึงเกิดความเสียหายทางกายภาพเพียงเล็กน้อยและไม่เกิดความแตกต่างของความดันเซลล์จึงสูญเสียน้ำน้อยมาก เนื้อสัมผัสของอาหารจึงยังคงดีอยู่ แต่อัตราเร็วของการแช่แข็งที่สูงเกินไป อาจทำให้เกิดแรงเค้นภายในอาหาร และทำให้เนื้อเยื่อเกิดการแตกหรือแยกออกจากกันได้

ผลกระทบของการเก็บรักษาหลังการแช่แข็ง โดยทั่วไปถ้าอุณหภูมิในการเก็บรักษายิ่งต่ำ อัตราการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทางชีวเคมีก็จะยิ่งต่ำลงเช่นกัน ดังนั้นการแช่แข็งและการเก็บรักษาหลังการแช่แข็งไม่ได้เป็นการทำลายเอนไซม์ ในการแปรรูปผักและผลไม้ด้วยวิธีการแช่แข็ง มักนิยมลวกผักและผลไม้ก่อน เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักและผลไม้ หรืออาจจะมีการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในผักและผลไม้โดยการกำจัดออกซิเจน การเติมกรดหรือการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงสำคัญในระหว่างการเก็บรักษาผักและผลไม้แช่แข็ง คือ รงค์วัตถุ คลอโรฟิลล์จะค่อยๆเปลี่ยนเป็นฟีโอไฟทิน (Pheophytin) ซึ่งมีสีน้ำตาล แม้ผักจะผ่านการลวกแล้วก็ตาม การตกตะกอนของเกลือในสารละลายเข้มข้นในผลไม้ทำให้ pH และสีของแอนโทไซยานินเปลี่ยนไป ซึ่งจะกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ การสูญเสียคุณภาพในผักและผลไม้ที่ไม่ผ่านการลวกอย่างเพียงพอขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสมากที่สุด เอนไซม์ดังกล่าวทำให้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล ทำให้ผักผลไม้เกิดสีน้ำตาลได้

แบคทีเรียที่ผลิต AFP มีดังนี้

∞ และ gamma Proteobacterium แยกจากน้ำทะเลสาบที่เค็มจัดที่ Vesfold Hill และ Larsemann Hills บริเวณแอนทราคติก ตะวันออก มีกิจกรรมในการยับยั้งการเกิดผลึกน้ำแข็ง

cold-adapted bacteria ได้แก่ *Pseudomonas putida*, *P. fluorescences*, *Marinomonas, Pantoea(Erwinia), Xanthomonas* และ *Moraxella* sp. ที่แยกได้จากบริเวณแอนทรา

คติก สร้าง AFPs ต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง และผลงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความสามารถปรับตัวให้ทนทานต่อสภาพเย็นจัดได้โดยการผลิต AFP(Chattopadhyay, 2007; Muryoi *et al*., 2004)

Marinomonas primoryensis และ *Flavobacterium xanthum* ที่แยกได้จากทะเลสาบน้ำเค็ม บริเวณแอนทราคติก ได้พยายามโคลนยีนจากแบคทีเรียเหล่านี้แล้ว แต่ได้ผลเป็นยีนอื่นๆ

9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

คัดเลือกแบคทีเรียทนเย็นได้ 5 สกุล ได้แก่ *P. putida*(antifreeze protein), *Flavobacterium* sp. (antifreeze protein), *B. thuringiensis*(Neub family protein with antifreeze-like domains), *B. subtilis, Proteobacterium* sp.(typeI antifreeze protein) และ *O. intermedium*(cold shock protein CSPA) สามารถโคลนยีนแบคทีเรียได้ 3 ยีน คือ Neub family protein with antifreeze-like domains จาก *Bacillus cereus* ขนาด 984 nucleotides และ antifreeze glycopeptide AFGP related protein จาก *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* ขนาด 1887 nucleotides และ *afp*III จากปลาน้ำลึก *Macrozoarces americanus* clone15typeIII 1 ยีน ขนาด 267 nucleotides สามารถเหนี่ยวนำให้ recombinant *E. coli* BL21 ผลิตโปรตีน AFP ได้โปรตีนของปลา, *B. cereus* และ *X. campestris* ขนาด 8, 30.4 และ 58.3 KDa ตามลำดับ การทำให้ AFP บริสุทธิ์ ยังไม่ได้โปรตีนบริสุทธิ์ และได้โปรตีนน้อย แต่ โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง ที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ สามารถลดความเสียหาย เนื่องจากการแช่แข็ง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กรรมวิธีและความเข้มข้นของโปรตีนและน้ำตาลที่ใช้ จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนให้เหมาะสม ที่สำคัญคือ การละลายน้ำแข็ง จำเป็นต้องใช้เทคนิคทางสาขาวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือทำให้ละลายที่ความร้อนสูงอย่างรวดเร็ว เพื่อทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดเล็กลง

10. การนำผลการทดลองไปใช้ประโยชน์

นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

11. เอกสารอ้างอิง

Makarevich, A.V., P. Kubovicova, D. Fabian, S. Cikos, J. Pivko and P. Chrenek. 2010. Several aspects of animal embryo cryopreservation : anti-freeze protein(AFP) as a potential cryoprotectant. Zygote. 18(2) : 145-153.

Chattopadhyay, M. K. 2007. Antifreeze proteins of bacteria. *Resonance*. p. 25-30.

Ferrer, B. R. 2009. Method for freezing fruit and vegetable produce. US Patent 2011/0027439 A1.

Jarzabek, M., P. M. Pukacki and K. Nuc. 2009. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces(*Picea* spp.). *Crybiol.* 58: 268-274.

Kawahara, H., J. Li, M. Griffith and B. R. Glick. 2001. Relation between antifreeze protein and freezing resistance in Pseudomonas putida GR12-2. *Curr. Microbiol*. 43 : 365-370.

Kristiansen, E., H. Ramlov, P. Hojrup, S. A. Pedersen, L. Hagen and K. E. Zachariassen. 2011. Structural characteristics of a novel antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium inquisitor*. *Ins. Biochem. Mol. Biol*. 41:109-117.

Muryoi, N., M. Sato, S. Kaneko, H. Kawahara, H. Obata, M. W. F. Yaish, M. Griffith and B. R. Glick. 2004. Cloning and expression of *afp*A, a gene encoding an antifreeze protein from the Arctic plant growth-promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. J. Bacteriol. 186(17) : 5661-5671.

Payne, Sandford, Harris & Young, 1994

Thenmozhi, T. 2006. Sequence analysis of anti-freeze protein. M.Sc. Thesis. Annamalai Univ. Annamalai Nagar. 88 p.

Wu, L., T. Orikasa, K. Tokuyasu, T. Shiina and A. Tagawa. 2009. Applicability of vacuum-dehydrofreezing technique for the long-term preservation of fresh-cut eggplant : Effects of process conditions on the quality attributes of the samples. *J. Food Eng*. 91(4) : 560-565.

Zhang, D-Q, B. Liu, D-R Feng, Y-M He and J-F Wang. 2004. Expression, purification, and antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants. Pro. Exp. Purif. 35 : 257-263.

.....