

เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสและสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสจากพลาสมาเลือดหมู:
การแยกและการประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิ
Transglutaminase and Proteinase Inhibitor from Pig Plasma:
Isolation and Application as Surimi Gel Enhancer



จันทิรา ศรีวิลัย
Chantira Srivilai

Order Key 27485
HBB Key 174351

เลขหมู่ TX 003.E6 760 8020 2
เลขทะเบียน.....
..... 7.4 เม.ย. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Food Technology
Prince of Songkla University

2543

ชื่อวิทยานิพนธ์ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสและสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจากพลาสมา

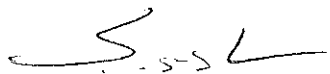
เลื้อคหุ: การแยกและการประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิ

ผู้เขียน นางสาวจันทิรา ศรีวิลัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร

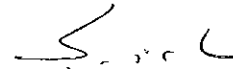
คณะกรรมการที่ปรึกษา

คณะกรรมการสอบ



.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทนต์ เบญจกุล)



.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทนต์ เบญจกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาลิก)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาลิก)

.....กรรมการ

(อาจารย์ วรพงษ์ อัสวเกสมณี)

.....กรรมการ

(อาจารย์ วรพงษ์ อัสวเกสมณี)

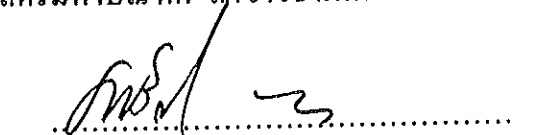
.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อริญ หันพงศ์กิตติกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทา เชิงเขาวัว)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร



(รองศาสตราจารย์ ดร. นพรัตน์ บำรุงรักษ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสและสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจาก
ปลาสมาลีอดหมู: การแยกและการประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มความแข็ง
แรงของเจลซูริมิ
ผู้เขียน นางสาวจันทิรา ศรีวิสัย
สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

เลือดหมูเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงฆ่าสัตว์สามารถนำมาแยกปลาสมาลีอดหมูเพื่อใช้สำหรับเป็นสารเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิ สภาวะที่เหมาะสมของการเติมปลาสมาลีอดหมูในซูริมิจากปลาตาหวาน (*Priacanthus tayemus*) คือ การเติมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดยให้ค่าแรงเจาะทะลุ (breaking force) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (deformation) สูงสุด เจลซูริมิที่ได้มีการละลายในสารละลายผสมของโซเดียมโคเดซิลซัลเฟต (ร้อยละ 1) ยูเรีย (8 โมลาร์) และเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล (ร้อยละ 2) ลดลง เนื่องจากมีพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์เกิดมากขึ้น อย่างไรก็ตามค่าความขาวของเจลซูริมิจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของปลาสมาลีอดหมูเพิ่มขึ้น ปลาสมาลีอดหมูที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ปาเปน เอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อและเครื่องในปลาตาหวาน และกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาตาหวานบดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถป้องกันการย่อยสลายไมโอซิน ของเนื้อปลาตาหวานบด

จากการแยกส่วนปลาสมาลีอดหมูโดยวิธี Cohn's method ได้แฟรกชันจำนวน 5 แฟรกชัน คือ แฟรกชัน I II+III IV IV-I ซึ่งได้ผลผลิตร้อยละ 2.19 1.34 5 และ 4.2 ของปลาสมาลีอดหมู และแฟรกชัน I-S ร้อยละ 72.3 ของแฟรกชัน I (โดยน้ำหนักแห้ง) การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส โดยทดสอบด้วย MDC-incorporating activity assay พบว่า แฟรกชัน I-S มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 223.39 ± 14.05 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 35-55 องศาเซลเซียส

ต้องการแคลเซียมไอออนและทรมอนบินสำหรับกระตุ้นการทำงาน และถูกยับยั้งกิจกรรมโดย *N*-ethylmaleimide (NEM) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส พบว่า แฟรกชัน IV-I สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ปาเปน เอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อและเครื่องในปลาตาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยประสิทธิภาพการยับยั้งขึ้นกับความเข้มข้นของแฟรกชัน

เมื่อศึกษาการเติมแฟรกชันที่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส (แฟรกชัน IV-I) ในซูริมิจากปลาตาหวานที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า แฟรกชัน IV-I สามารถยับยั้งการเกิดโมโครีโนเจลซูริมิจากปลาตาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถป้องกันไมโอซินของเนื้อปลาตาหวานจากกระบวนการย่อยสลายตัวเอง อย่างไรก็ตามค่าความขาวจะลดลงเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นของแฟรกชัน IV-I เพิ่มขึ้น สำหรับการเติมแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (แฟรกชัน I-S) ในเจลซูริมิจากปลาตาหวานที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรมอนบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ให้ค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุสูงสุด การละลายในสารละลายผสมของโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต (ร้อยละ 1) ยูเรีย (8 โมลาร์) และเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล (ร้อยละ 2) ลดลง เนื่องจากมีพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์เกิดมากขึ้น อย่างไรก็ตามค่าความขาวของเจลซูริมิไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อความเข้มข้นของแฟรกชัน I-S เพิ่มขึ้น การเติมแฟรกชัน I-S ในเจลซูริมิจึงทำให้เกิดพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพิ่มขึ้นซึ่ง บังชี้การเชื่อมประสานของโปรตีนไมโอซิน ดังนั้นแฟรกชันของพลาสมาเลือดหมูสามารถเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิจากปลาตาหวานโดยทำหน้าที่ยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและ/หรือเพิ่มการเชื่อมประสานของโปรตีน

Thesis Title **Transglutaminase and Proteinase Inhibitor from Pig Plasma :
Isolation and Application as Surimi Gel Enhancer**

Author **Miss Chantira Srivilai**

Major Program **Food Technology**

Academic Year **2000**

Abstract

Pig plasma protein (PPP) was isolated from pig blood, by-product from slaughtering process. PPP could be used as an important additive to improve the gel properties of surimi from bigeye snapper (*Priacanthus tayemus*). The optimum conditions for PPP addition involved mixing PPP with surimi at a final concentration of 0.5% (w/w), followed by incubating at 35 °C for 90 min. Gel obtained had the highest force and deformation with a decrease in solubility in solution containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 8 M urea and 2% β-mercaptoethanol (βME). This result suggested that non-disulfide covalent bonds were formed. However, the whiteness of surimi gel was reduced as PPP concentration increased. At level of 1%, PPP showed an effective inhibitory activity towards trypsin, papain, proteinase from viscera and fish muscle as well as autolysis. Myosin in bigeye snapper mince was more retained when higher concentration of PPP was added.

Five PPP ethanol fractions including fraction I, II+III, IV, IV-I and I-S were prepared by Cohn's method. The yield of fraction I, II+III, IV and IV-I were 2.19, 1.34, 5 and 4.2 % of pig plasma, respectively. Fraction I-S yielded 72.3 % of fraction I (dry basis). Fraction I-S showed the highest transglutaminase activity (223.39±14.05 unit/g protein) by using MDC-incorporating activity assay. The marked increase in activity was found at the temperature ranging from 35 to 55 °C. Activity was activated by Ca²⁺ and

thrombin, and was inhibited by *N*-ethylmaleimide (NEM), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and ammonium chloride (NH₄Cl). Fraction IV-I exhibited a proteinase inhibitory activity towards trypsin, papain, proteinases from viscera and fish muscle in a concentration dependent manner.

Fraction with proteinase inhibitory activity (fraction IV-I) was added into bigeye snapper surimi at a concentration of 0.3% (w/w) and incubated at 60 °C for 2 hrs. Fraction IV-I could prevent the modori phenomenon in bigeye snapper surimi. Myosin heavy chain was protected from degradation caused by endogenous proteinase. However, the whiteness of surimi gel was decreased when a higher concentration was used. Fraction with transglutaminase activity (fraction I-S) was added into bigeye snapper surimi at concentration of 0.2% (w/w) in the presence of 100 mM, CaCl₂ and 100 NIH unit thrombin/g fraction, and incubated at 37 °C for 90 min, resulting in increased force and deformation of surimi gel. The solubility of surimi gel added with fraction I-S in solution containing 1% SDS, 8 M urea and 2% βME was decreased, suggesting that non-disulfide covalent bonds were formed. However, no changes in whiteness of surimi gel were observed as the fraction I-S concentration increased. The addition of fraction I-S into bigeye snapper surimi resulted in polymerization of myosin heavy chain, indicating the induced cross-linking of proteins. Therefore, pig plasma fractions can be used as a processing aid for surimi gel improvement via prevention of proteolysis and/or inducing the cross-linking of protein.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทรวัดน์ เบนญกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาในคำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ไพบุลย์ ธรรมรัตน์วาลิก และอาจารย์วรพงษ์ อัสวเกษตร กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทา เจริงเขาว์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้อง และสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย พี่สาว น้องชาย และ น้องสาว ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด ขอขอบพระคุณโรงพยาบาลสัตว์เทศบาลนครหาดใหญ่ และ บริษัทแปซิฟิกแปรรูปสัตว์น้ำ จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อวัตถุดิบสำหรับการวิจัย รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่มีส่วนให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ สมบูรณ์ด้วยดี

จันทิรา ศรีวิสัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(2)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(12)
รายการตารางผนวก	(16)
รายการรูปผนวก	(25)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
เลือด	3
ซูริมิ	6
เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส	12
เอนไซม์โปรตีเอส	21
วัตถุประสงค์	27
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	28
วัสดุ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการทดลอง	30
1) การเตรียมพลาสติกจากเลือดหมู	30
2) ศึกษาผลของการเติมพลาสติกต่อความแข็งแรงของเจลซูริมิ	30

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสของพลาสมา เลือดหมู	31
4) ศึกษาการแยกส่วนองค์ประกอบในพลาสมาเลือดหมู และการตรวจ สอบคุณสมบัติของแฟรกชัน	32
5) การประยุกต์ใช้แฟรกชันที่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสและแฟรกชัน ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในเจลซูริมิ	34
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	36
1) การศึกษาผลของพลาสมาเลือดหมูต่อความแข็งแรงของเจลซูริมิ	36
2) การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอส ของพลาสมาเลือดหมู	55
3) การศึกษาการแยกส่วนองค์ประกอบของพลาสมาเลือดหมู และการ ตรวจสอบคุณสมบัติของแฟรกชัน	60
4) การประยุกต์ใช้แฟรกชันที่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสและแฟรกชัน ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในเจลซูริมิ	74
4. สรุปผลการทดลอง	93
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	107
ประวัติผู้เขียน	160

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ชนิดและปริมาณของโปรตีนในพลาสติกสัตว์	5
2 ผลของสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส	14
3 ผลของแคลเซียมไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส	15
4 ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากเนื้อปลาและซูริมิชนิดต่างๆ	18
5 ปริมาณ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ที่พบในกล้ามเนื้อปลาและสัตว์ทะเลชนิดต่างๆ	19
6 เอนไซม์โปรตีเอสที่พบในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำ	24
7 ความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกเลือด หมูร้อยละ 0.5 และแช่ตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน	42
8 ความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกเลือด หมูร้อยละ 0.5 และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน	48
9 ความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกเลือด หมูที่ความเข้มข้นต่างๆ และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน	54
10 ผลของแคลเซียมไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในเฟรกชัน I และเฟรกชัน I-S	66
11 ผลของสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในเฟรกชัน I และเฟรกชัน I-S	67
12 ความขาวและปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล โมโดริที่เติมเฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน	77

รายการตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
13 ความขาวและปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูริมิที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน	82
14 ความขาวและปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูริมิที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ความเข้มข้น ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน	86
15 ความขาวและปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูริมิที่เติมทรอมบินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ความเข้มข้น ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ แช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน	90

รายการรูป

รูปที่	หน้า	
1	ขั้นตอนการผลิตซูริมิ	7
2	การเกิดโครงสร้างตาข่ายเจลของสายโซ่โปรตีน	8
3	ขั้นตอนการเกิดเจลคามาโบ โคะ	11
4	การทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในสถานะที่มีตัวร่วมทำปฏิกิริยา ต่างๆ กัน	13
5	ปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด	17
6	แรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูริมิที่เติมพลาสติก หมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	40
7	การละลายของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่ อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	41
8	แรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูริมิที่เติมพลาสติก หมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ	44
9	การละลายของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ	46
10	แรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกหมู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	50
11	การละลายของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกหมูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	52
12	ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ปาเปน โปรตีนเนสจากกล้ามเนื้อและ เครื่องในปลาตาหวาน ของพลาสติกหมูที่ความเข้มข้นต่างๆ	56
13	ประสิทธิภาพของพลาสติกในการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อ ปลาตาหวานชนิดที่ผ่านการล้างน้ำ และไม่ผ่านการล้างน้ำ	58

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
14 รูปแบบการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เติมพลาสติกหุ้มที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย SDS-PAGE (12% running gel และ 4% stacking gel) โดยใช้ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม	59
15 กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชันต่างๆ	61
16 รูปแบบโปรตีนของแฟรกชันต่างๆ และพลาสติกหุ้ม โดย SDS-PAGE (10% running gel และ 4% stacking gel) โดยใช้ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม	62
17 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I และแฟรกชัน I-S	64
18 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินของแฟรกชัน I II+II IV IV-I และ I-S	69
19 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ปาเปนของแฟรกชัน I II+II IV IV-I และ I-S	69
20 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสจากกล้ามเนื้อปลาตาหวานของแฟรกชัน I II+III IV IV-I และ I-S	70
21 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสจากเครื่องในปลาตาหวานของแฟรกชัน I II+II IV IV-I และ I-S	70
22 ความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสจากแฟรกชัน IV-I	72
23 รูปแบบการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย SDS-PAGE (10% running gel และ 4% stacking gel) โดยใช้ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม	73
24 แรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูริมิจากที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	75

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
25 การละลายของเจลซูริมิจากที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และปมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	76
26 ค่าแรงเกาะทะเล และระยะทางก่อนเกาะทะเลของเจลซูริมิที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทروมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	79
27 การละลายของเจลซูริมิที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทروมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	81
28 แรงเกาะทะเล และระยะทางก่อนเกาะทะเลของเจลซูริมิที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทروมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	84
29 การละลายของเจลซูริมิที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทروมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	85
30 แรงเกาะทะเล และระยะทางก่อนเกาะทะเลของเจลซูริมิที่เติมทروมบีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	88
31 การละลายของเจลซูริมิที่เติมทروมบีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	89

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
32	90

รูปแบบของโปรตีนเจตซูริมิจากปลาตาหวานที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลลาร์ ทรมอบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเชื้อตัวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดย gradient SDS-PAGE (5-10% running gel และ 4% stacking gel) โดยใช้ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม

รายการตารางผนวก

ตารางผนวกที่	หน้า
1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเฉาะทะเลของเจลซูวารีที่เติมพลาสติก เลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	129
2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเฉาะทะเลของเจลซูวารีที่เติม พลาสติกเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	129
3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเฉาะทะเลของเจลซูวารีที่เติมพลาสติก เลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่าน การให้ความร้อน	130
4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเฉาะทะเลของเจลซูวารีที่เติม พลาสติกเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	130
5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกเลือด หมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	131
6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกเลือด หมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ ความร้อน	131
7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล ซูวารีที่เติมพลาสติกเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	132
8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล ซูวารีที่เติมพลาสติกเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	132

รายการตารางผนวก(ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมพลาสติก เลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ	133
10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติม พลาสติกเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ	133
11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมพลาสติก เลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	134
12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติม พลาสติกเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา ต่างๆ ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	134
13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวาริที่เติมพลาสติกเลือด หมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ	135
14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวาริที่เติมพลาสติกเลือด หมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่าน การให้ความร้อน	135
15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล ซูวาริที่เติมพลาสติกเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ	136
16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล ซูวาริที่เติมพลาสติกเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	136
17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมพลาสติก เลือดหมูที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	137

รายการตารางผนวก(ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมวลที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	137
19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมวลที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	138
20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมวลที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	138
21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมวลที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	139
22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมวลที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	139
23 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมวลที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	140
24 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมวลที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	140
25 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชันต่างๆ	141
26 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I	141

รายการตารางผนวก(ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
27 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I-S	141
28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I	142
29 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I-S	142
30 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I	142
31 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I-S	143
32 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจล โม โครรีที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และปมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	143
33 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจล โม โครรีที่ เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	144
34 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจล โม โครรีที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	144
35 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจล โม โครรีที่เติม แฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	145
36 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจล โม โครรีที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	145

รายการตารางผนวก(ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
37 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจล โม โครที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ แลเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	146
38 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล โม โครที่เติมแฟรกชัน I V-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	146
39 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล โม โครที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	147
40 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	147
41 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	148
42 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	148

รายการตารางผนวก(ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
43 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูวารีที่เติม แฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน ซึ่งเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	149
44 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	149
45 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	150
46 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล ซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	150
47 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล ซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	151
48 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวารีที่เติมแคลเซียม คลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 90 นาที	151

ตารางภาคผนวก(ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
49 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	152
50 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	152
51 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	153
52 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	153
53 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	154
54 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	155

รายการตารางผนวก(ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
55 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจล ซูวารีที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	155
56 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเกาะทะลุของเจลซูวารีที่เติมทรอมบิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	155
57 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเกาะทะลุของเจลซูวารีที่เติม ทรอมบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียม คลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	156
58 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเกาะทะลุของเจลซูวารีที่เติมทรอมบิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	156
59 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนและระยะทางก่อนเกาะทะลุของเจลซูวารีที่เติม ทรอมบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียม คลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	157
60 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลซูวารีที่เติมทรอมบินที่ ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	157

รายการตารางผนวก(ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
61 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติมทรอมบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	158
62 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวารีที่เติมทรอมบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที	158
63 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวารีที่เติมทรอมบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน	159

รายการรูปผนวก

รูปผนวกที่	หน้า
ง1. กราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin	120
ง2. กราฟมาตรฐานไทโรซีน	122

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ซูริมิใช้เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่ให้ลักษณะเจลที่ยืดหยุ่น เช่น กามาโบกะ ชิควา ไส้กรอก รวมถึงปูเทียมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ซูริมิสามารถผลิตได้จากปลาหลายชนิด ซึ่งปลาแต่ละชนิดให้คุณภาพของเจลแตกต่างกันไป ทั้งนี้เป็นผลมาจากองค์ประกอบของโปรตีนและความสมบูรณ์ของโปรตีนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้เอนไซม์มีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพของเจลซูริมิโดยเอนไซม์อาจมีผลในการลดหรือเพิ่มคุณภาพของเจลซูริมิ ดังนั้นการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสเพื่อป้องกันการย่อยสลายโปรตีนซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเจล แต่ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ที่ช่วยในการเชื่อมประสานโปรตีน เช่น เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase) จึงเป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพของเจลซูริมิให้ดีขึ้น

เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส เป็นเอนไซม์ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลา ทำหน้าที่เร่งการเชื่อมประสานระหว่าง γ -carboxamide ของกลูตามีน กับหมู่เอมีนของไลซีน เกิดเป็นพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine การแช่ตัวของซูริมิก่อนการให้ความร้อนมีผลให้เจลมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นอันเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสภายในเนื้อปลาสด (Tsukamasa and Shimizu, 1990; Seki *et al.*, 1990; Araki and Seki, 1993) การเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ (Sokamoto *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1996) หรือเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากพลาสมาเลือดหมู (Factor XIII) (Jiang and Lee, 1992) มีผลให้เจลซูริมิมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น

การเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสซึ่งมีบทบาทสำคัญในการอ่อนตัวของเจล (โมโดริ) เป็นแนวทางในการป้องกันการทำลายโครงสร้างเจลในซูริมิ การใช้สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส เช่น พลาสมาจากเลือดวัว (BPP) ไช่ขาว โปรตีนเวย์ สารสกัดจากถั่วเหลือง สามารถป้องกันการอ่อนตัวของเจล (Traore and Meunier, 1992; Mahmoud and

Savello, 1993) แต่อาจก่อให้เกิดผลเสียต่อลักษณะปรากฏหรือลักษณะทางประสาทสัมผัส เช่น สี กลิ่นรส เปลี่ยนแปลงไป

ในกระบวนการฆ่าหมูจะได้เลือดหมูเป็นปริมาณมาก คือ ร้อยละ 2.5-3.5 ของน้ำหนักตัวหมู เลือดที่ได้ส่วนหนึ่งจะขายในท้องตลาดในรูปของเลือดหมูที่ตกตะกอน และส่วนหนึ่งจะใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์ แต่ก็ยังไม่มีให้นำเลือดหมูที่ได้มาใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากพลาสมาเลือดหมูโดยการแยกสารที่มีมูลค่าเพิ่มซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส และสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส สำหรับเป็นสารเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิ จึงเป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพเจลซูริมิ และลดปัญหาที่ไม่พึงประสงค์จากสี กลิ่นของพลาสมา ตลอดจนสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับเลือดหมูซึ่งมีปริมาณมากในประเทศไทย

ตรวจเอกสาร

1. เลือด

1.1 องค์ประกอบของเลือด

เลือดเป็นสารคอลลอยด์ของโปรตีนมีอยู่ประมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัว เมื่อแยกเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวซึ่งรวมกันเรียกว่า corpuscle ออกจะเหลือส่วนที่เป็นของเหลวมีสีเหลืองซีดเรียกว่าพลาสมา (plasma) แต่ถ้าแยก corpuscle และ fibrinogen ออกจะเหลือของเหลวใสเรียกว่า ซีรัม (serum) (ไววิทย์ พุทธารี และคณะ, 2523)

ไววิทย์ พุทธารี และคณะ (2523) กล่าวว่า เลือดเป็นของเหลวในร่างกายที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular fluid) จะพบอยู่ภายในเส้นเลือด ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่าน้ำเลือด และส่วนที่เป็นเซลล์

1.1.1 น้ำเลือด (blood plasma) หรือพลาสมาเลือด น้ำเลือดเป็นของเหลวเกือบใส มีปริมาณร้อยละ 55-57 ของเลือด ประกอบด้วยสารหลายอย่าง คือ

- 1) น้ำ มีปริมาณร้อยละ 90 น้ำทำหน้าที่ละลายและแขวนลอยสารต่างๆ ทำให้เกิดมีประจุ (ionization) และนำความร้อน
- 2) อิเล็กโตรไลต์ มีปริมาณร้อยละ 1 ของน้ำเลือด เช่น โซเดียม แคลเซียม โพแทสเซียม โดยสารอิเล็กโตรไลต์ มีหน้าที่ทำให้เกิดแรงดันออสโมซิส ทำให้เนื้อเยื่อต่างๆ สามารถสนองต่อสิ่งกระตุ้น นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์
- 3) โปรตีน มีปริมาณร้อยละ 6-8 ของน้ำเลือด มีหน้าที่ทำให้เลือดมีความข้นหนืด และมีความดันออสโมซิส ช่วยปรับปริมาตรของเลือด ช่วยรักษาสมดุลย์ของน้ำในร่างกาย ช่วยให้เลือดแข็งตัวเมื่อเป็นบาดแผล โปรตีนที่พบในน้ำเลือดคือ อัลบูมิน โกลบูลิน เมต้าโกลบูลิน อัลฟาโกลบูลิน และไฟบริโนเจน
- 4) สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน ในเลือด 100 มิลลิลิตร จะพบสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนประมาณ 33 มิลลิกรัม โดยประกอบด้วย ยูเรีย ประมาณ 8-25 มิลลิกรัม ครีเอตินีน (creatinine) ประมาณ 0.7-15 มิลลิกรัม
- 5) กลูโคส มีประมาณ 60-100 มิลลิกรัม ใน 100 มิลลิลิตรของเลือด ทำหน้าที่เป็นแหล่งของพลังงานให้แก่เนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย

6) ไขมัน เลือด 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยกรดไขมันประมาณ 190-420 มิลลิกรัม โคลเลสเตอรอลประมาณ 159-280 มิลลิกรัม และไตรกลีเซอไรด์ประมาณ 120 มิลลิกรัม Donnelly และ Delaney (1977) ได้ทำการศึกษาปริมาณ โคลเลสเตอรอลในซีรัม เลือดจากสัตว์ต่างๆ คือ วัว แกะ แพะ และสุกร พบว่า มีโคลเลสเตอรอล 2.1-3.1 1.3-1.9 2.1-3.3 และ 0.9-1.4 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ

7) เอนไซม์ มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีต่างๆ

8) ก๊าซที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ คือ ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์

9) วิตามิน เช่น วิตามินเอ วิตามินดี โทโคเฟอรอล ไทอามิน ไรโบฟลาวิน

1.1.2 ส่วนที่เป็นเซลล์ และชิ้นส่วน ประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และแผ่นเลือด

เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์สร้างจากไขกระดูก แล้วจึงปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด มีหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปยังเยื่อต่างๆ ขนส่งคาร์บอนไดออกไซด์ไปยังปอด ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงทำหน้าที่เป็นรงควัตถุที่ใช้ในการหายใจ (respiratory pigment) มีความสามารถรวมตัวกับก๊าซต่างๆ

แผ่นเลือด แผ่นเลือดเป็นส่วนของชิ้นไซโตพลาสซึมของเซลล์ ที่มีขนาดใหญ่ เรียกว่า เมกาคารีโอไซด์ (megakaryocyte) แผ่นเลือดมีจำนวนประมาณ 250,000-350,000 ชิ้นต่อหนึ่งลูกบาศก์เซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 ไมโครเมตร มีหน้าที่สำคัญในการแข็งตัวของเลือด

Faraji และ Decker (1991) พบว่า พลาสมาเลือดหมูมีโปรตีนร้อยละ 9.1±0.35 ความชื้นร้อยละ 90.9±0.04 เถ้าร้อยละ 1.0±0.05 และเหล็ก 2.0±0.42 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม Jobling (1986) กล่าวว่า เลือดหมูมีโปรตีนร้อยละ 17-19 เมื่อเหวี่ยงแยกตะกอนจะได้พลาสมาร้อยละ 60-70 ประกอบด้วยโปรตีนประมาณร้อยละ 10 (อัลบูมิน โกลบูลิน และไฟบริโนเจน)

Donnelly และ Delaney (1977) พบว่า พลาสมาประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ อัลบูมิน โกลบูลิน และไฟบริโนเจน ซึ่งสอดคล้องกับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณโปรตีนในพลาสมาจากสัตว์

ชนิดสัตว์	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)	โกลบูลิน			อัลบูมิน (กรัมต่อลิตร)	ไฟบริโนเจน (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนของ อัลบูมินต่อ โกลบูลิน
		α	β	γ (กรัมต่อลิตร)			
วัว	71.0	9.0	10.0	21.0	34.0	3.0-7.0	1.0
แกะ	70.0	12.0	5.0	14.0	29.0	1.0-5.0	0.7
แพะ	71.0	-	-	-	-	1.0-4.0	-
สุกร	84.0	17.0	13.0	16.0	35.0	3.0-7.0	0.6

ที่มา : ดัดแปลงจาก Donnelly และ Delaney (1977)

1.2. การแยกส่วนพลาสมา

Delaney (1977) กล่าวว่า นำเลือดหมูมาเติมสารป้องกันการตกตะกอน แล้วเหวี่ยงแยกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้เข้มข้นโดยการกรองผ่านเยื่อกรอง (ultrafiltration) และทำแห้งพลาสมาโดยวิธีพ่นฝอย (spray drying) Johnson และคณะ (1979) นำเลือดวัวมาเติมสารป้องกันการตกตะกอนที่ประกอบด้วย โซเดียมซัลเฟตร้อยละ 0.25 และ โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1,000xg แยกพลาสมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -28 องศาเซลเซียส Faraji และ Decker (1991) ได้นำเลือดหมูมาเติมสารละลายที่ประกอบด้วย โซเดียมซัลเฟตร้อยละ 0.5 เหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 900xg เป็นเวลา 30 นาที เก็บพลาสมาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปใช้ภายใน 4 วัน Donnelly และ Delaney (1977) พบว่า การแยกพลาสมาเลือดหมูโดย gel filtration สามารถแยกองค์ประกอบของพลาสมาได้ 3 ส่วน ส่วนแรกคือ แอลฟาโกลบูลิน ส่วนที่สองคือ แกรมมา แอลฟา และ เบต้าโกลบูลิน ส่วนที่สามได้แก่ อัลบูมิน แอลฟา และเบต้าโกลบูลิน

วิธีการแยกส่วนพลาสมาเป็นการแยกส่วนที่ไม่ต้องการ เช่น อัลบูมิน และ ฮีโมโกลบิน ออกจากเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสและสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส (α_2 -macroglobulin) เพื่อเป็นการลดกลิ่นและสีที่ไม่ต้องการ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจับอยู่

กับไฟบริโนเจนอย่างแน่นอน (Greenberg and Shuman, 1982) ไฟบริโนเจนในพลาสมา มีประมาณ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (White *et al.*, 1973) การแยกไฟบริโนเจนสามารถกระทำได้โดยการตกตะกอนด้วยเอธานอลร้อยละ 8-10 ที่อุณหภูมิ 0 ถึง -3 องศาเซลเซียส (Pennel, 1960) ไฟบริโนเจนละลายได้น้อยในน้ำ (Stroder and Hormann, 1974) แต่สามารถละลายได้ใน ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ (พีเอช 7) (Lorand and Jacobsen, 1958) Lorand และ Gotoh (1970) ทำการแยกไฟบริโนเจนออกจากเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในพลาสมา โดยให้ความร้อนแก่พลาสมาเลือดวัว ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เพื่อตกตะกอนไฟบริโนเจน

Cohn และคณะ (1946) ได้แยกส่วนพลาสมามนุษย์ได้เป็นแฟรกชันต่างๆ โดยใช้เอธานอล การปรับพีเอช และการปรับค่า ionic strength ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส Pennel (1960) ศึกษาองค์ประกอบของแฟรกชันจากพลาสมาของมนุษย์ พบว่า แฟรกชัน I ที่แยกได้โดยการตกตะกอนด้วยเอธานอลร้อยละ 8 ประกอบด้วยไฟบริโนเจนร้อยละ 50-60 และอัลบูมินร้อยละ 7 แฟรกชัน II+III ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลร้อยละ 25 ประกอบด้วย แกรมมา-โกลบูลิน ร้อยละ 37 อัลบูมิน ร้อยละ 4 และไฟบริโนเจนร้อยละ 5 แฟรกชัน IV-1 ได้จากการตกตะกอนพลาสมาด้วยเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 18 ที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช 5.2 ประกอบด้วย α_2 -โกลบูลิน ร้อยละ 48 α_1 -โกลบูลิน ร้อยละ 11 β -โกลบูลิน ร้อยละ 24 และอัลบูมินร้อยละ 5

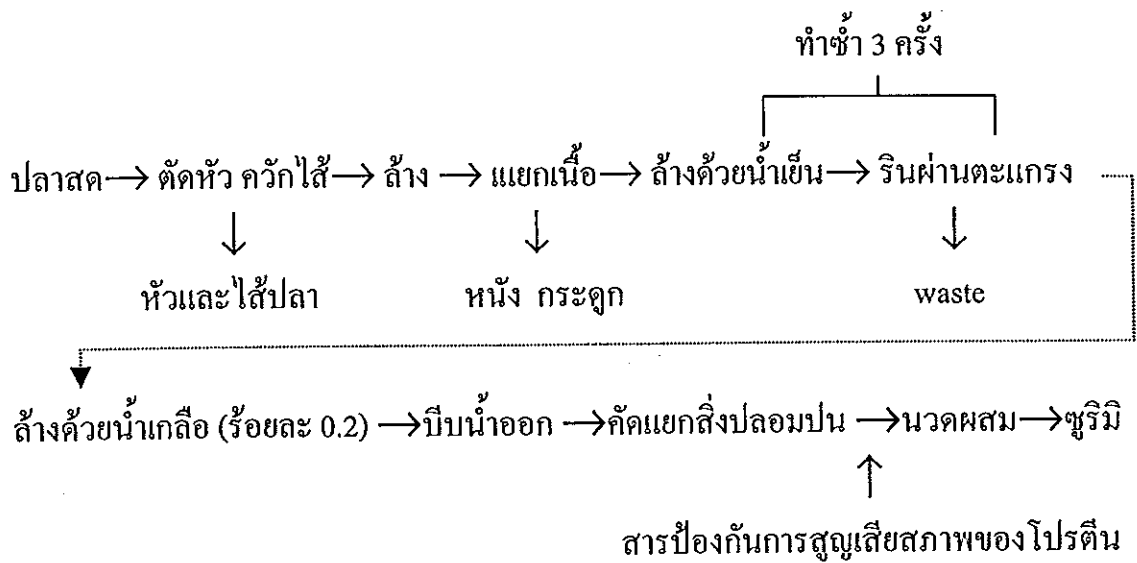
2. ชูริมิ

2.1 การผลิตชูริมิ

ชูริมิเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อปลาสดที่เตรียมได้โดยมีกระบวนการผลิตดังรูปที่ 1 ขั้นตอนสำคัญประกอบด้วย การแยกเนื้อปลาออกจากกระดูก แล้วนำเนื้อปลาดังนั้นมาล้างเพื่อกำจัดโปรตีนที่ละลายได้ ไขมัน และสารที่ทำให้เกิดกลิ่นคาว บีบน้ำและคัดแยกสิ่งปลอมปน หลังจากนั้นเติมสารป้องกันการสูญเสียสภาพของโปรตีนระหว่างการแช่เยือกแข็ง แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปลดอุณหภูมิให้บริเวณจุดกึ่งกลางของผลิตภัณฑ์ต่ำกว่า -18 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเก็บรักษาโดยควบคุมอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

(ม.อ.ก. 2533; สุทรวัดน์ เบญจกุล, 2536; Chang-Lee, 1989; Suzuki, 1981) ชูริมิสามารถใช้เป็นวัตถุดิบพื้นฐานในผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่เจตมึความยืดหยุ่น เช่น คามาโบโกะ ไส้กรอก ชิฏวา และผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคนิยมมากที่สุดในปัจจุบันคือ ปูเทียม (Niwa, 1992)

ชูริมิสามารถผลิตได้จากปลาหลายชนิด เช่น conger eel lizard fish croaker pollock และ Atka mackerel ซึ่งวัตถุดิบแต่ละชนิดจะให้ผลิตภัณฑ์เนื้อปลาบดที่มีลักษณะและคุณภาพแตกต่างกันไป (Lanier, 1992) Min และคณะ (1987) รายงานชนิดของปลาที่ใช้ในการผลิตชูริมิในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งได้แก่ threadfin bream (*Nemiptera* spp) bigeye snapper (*Priacanthus* spp) baracuda (*Sphyparena* spp) และ croaker (*Pennahia, Johnius* spp) ปลาส่วนใหญ่เป็นปลาเนื้อขาว

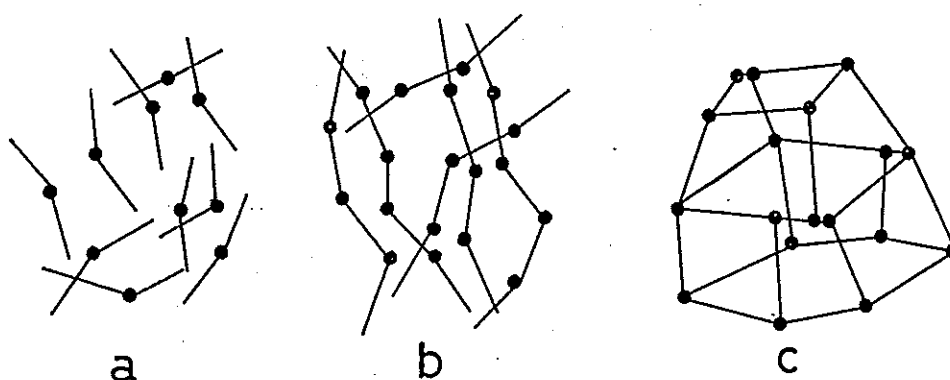


รูปที่ 1 ขั้นตอนการผลิตชูริมิ

ที่มา : คัดแปลงจาก Buck และ Fafard (1985)

2.2. การเกิดเจลของซูริมิ

การเกิดเจล (gelation) เป็นการเชื่อมประสาน (cross-linking) อย่างเป็นระเบียบของสายโซ่โปรตีน เกิดเป็นโครงสร้างตาข่าย 3 มิติ ซึ่งเก็บของเหลวไว้ในโครงสร้าง (Asgher *et al.*, 1985; Smith, 1991; Ziegler and Foegeding, 1991) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การเกิดโครงสร้างตาข่ายเจลของสายโซ่โปรตีน

(—) สายโซ่โปรตีน (●) การเชื่อมประสาน

a และ b ไม่เกิดโครงข่าย c โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นโครงข่าย

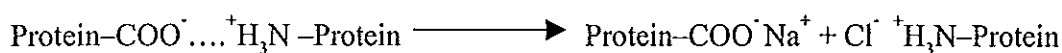
ที่มา: Niwa (1992)

ขั้นตอนการเกิดเจลประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ

1) การสูญเสียสภาพของโปรตีน (denaturation) เป็นผลให้โปรตีนคลายตัว เช่น การใช้เกลือผสมในเนื้อปลาสดที่ผ่านการล้างน้ำ ทำให้โปรตีนไมโอไฟบริลซึ่งเป็นโปรตีนชนิดที่ละลายในเกลือและเป็นโปรตีนส่วนใหญ่ในเนื้อปลาสดที่ผ่านการล้างน้ำเกิดการคลายตัว (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2536) นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการใช้กรดอินทรีย์เพื่อเพิ่มการคลายตัวของโปรตีน (Fretheim *et al.*, 1985) Chawla และคณะ (1996) พบว่า การเติมกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 ในเนื้อปลาทรายแดงสดที่ผ่านการล้างน้ำ ร่วมกับการแช่ตัวที่อุณหภูมิต่ำจะให้ค่าความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น เนื่องจากการแช่ตัวของเนื้อปลาสดที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน จะมีผลให้เกิดการรวมตัวของโปรตีนอย่างช้าๆ และเรียงตัวเป็น

ร่างแหอย่างเป็นระเบียบ เกลือเป็นสิ่งสำคัญที่สุดในการผลิตผลิตภัณฑ์จากซูริมิ เกลือจะทำหน้าที่เพิ่ม ionic strength ของเนื้อ ส่งผลต่อการละลายของแอกโตไมโอซิน ปริมาณเกลือที่เติมเพื่อให้การละลายและการทำหน้าที่ของแอกโตไมโอซินสูงสุดนั้นขึ้นกับชนิดและคุณภาพของปลา โดยทั่วไปปริมาณเกลือที่เหมาะสมซึ่งจะให้เจลที่มีความแข็งแรงอยู่ในช่วงร้อยละ 2-3 (Suzuki, 1981) การใช้เกลือในระดับความเข้มข้นสูงมีผลต่อการลดลงของการคงทนต่อความร้อนของโปรตีนจากเนื้อปลา ทำให้โปรตีนเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำ (Pigott and Tucken, 1990) นอกจากนี้การเติมเกลือในปริมาณสูงเกินไปก่อให้เกิดปรากฏการณ์ "salting out" ทำให้โปรตีนไม่ละลายในสารละลายเกลือส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลลดลง

เนื้อปลาล้างการเกร็งตัวหรือซูริมิซึ่งมีพีเอชอยู่ในช่วง 6.5-7.0 หมู่คาร์บอกซิลของกรดกลูตามิกและกรดแอสพาร์ติกจะมีประจุลบ ส่วนหมู่อะมิโนของไลซีนและอาร์จินีนจะมีประจุบวก ดังนั้นจึงเกิดการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลของประจุดังกล่าว ส่งผลให้โปรตีนไมโอไฟบริลเชื่อมต่อกันด้วยกันและไม่สามารถละลายน้ำ เมื่อเติมเกลือลงในซูริมิ เกลือจะแตกตัวและจับโปรตีนที่มีประจุตรงข้าม



ดังนั้นการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของโปรตีนไมโอไฟบริลจึงถูกขัดขวาง และโปรตีนละลายในน้ำได้มากขึ้นอันเป็นผลมาจากความสามารถในการจับกับน้ำได้มากขึ้น การเติมเกลือจะต้องกระทำควบคู่กับการกวนเพื่อเพิ่มการละลายของโปรตีน นอกจากนี้การกระจายตัวของโปรตีนเป็นสิ่งจำเป็นต่อการพัฒนาโครงสร้างของเจล (Lanier *et al.*, 1988)

2) การจัดเรียงตัว (aggregation) การจับตัวของโปรตีน มีผลให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของโปรตีนอย่างเป็นระเบียบเป็นโครงข่ายที่ห่อหุ้มน้ำและองค์ประกอบอื่นๆ ไว้ภายใน พันธะที่มีบทบาทต่อการสร้างโครงข่าย 3 มิติของโปรตีน (Mulvihill and Kinsella, 1987) ได้แก่

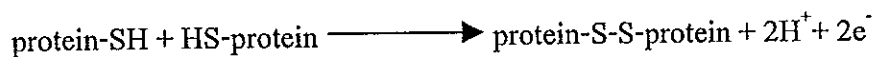
พันธะไฮโดรโฟบิก กรดอะมิโนร้อยละ 25 ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไมโอซิน เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) เมื่อกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำเหล่านั้น

สัมพันธ์กับ โมเลกุลน้ำ โมเลกุลของน้ำจำนวนมากจะจัดเรียงตัวกัน โดยพันธะไฮโดรเจนรอบๆ (hydrophobic hydration) แต่การจัดเรียงตัวของโมเลกุลน้ำดังกล่าวไม่ถาวร กรดอะมิโนจึงหันด้านที่ไม่ชอบน้ำเข้าไปใน โมเลกุลซึ่งมีผลต่อความคงทนของโครงสร้าง โมเลกุลของโปรตีน พันธะไฮโดรโฟบิกจะเกิดขึ้นเมื่อผ่านการให้ความร้อนกับโปรตีน พันธะชนิดนี้เกิดขึ้นจากปฏิกริยาระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ แต่เกิดขึ้นจากอิทธิพลของน้ำเป็นสำคัญ (Niwa, 1992)

Niwa (1992) พบว่า พันธะไฮโดรโฟบิกมีผลต่อการเสียดตัวของซูริมิ ที่อุณหภูมิสูง (40 องศาเซลเซียส) การเสียดตัวสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อมีเกลือ ทั้งนี้เนื่องจากเกลือจะทำให้ปฏิกริยากับน้ำและเพิ่มการเกิดพันธะไฮโดรโฟบิก

พันธะไฮโดรเจน มีความแข็งแรงน้อยแต่จะมีผลต่อความคงตัวของน้ำชนิดผูกพัน (bound water) โดยน้ำส่วนใหญ่จะจับกับกรดอะมิโนที่มีขั้วด้วยพันธะไฮโดรเจน ความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนจะลดลงเมื่อความร้อนเพิ่มสูงขึ้น แต่พันธะไฮโดรเจนมีผลต่อสภาพของโครงข่ายเจลซูริมิในกระบวนการลดอุณหภูมิของเจล (Niwa, 1992)

พันธะโควาเลนต์ พันธะชนิดนี้เป็นพันธะที่แข็งแรง ซึ่งจะเชื่อมต่อระหว่างพอลิเมอร์ พันธะโควาเลนต์ที่มีบทบาทต่อการเกิดเจลคือ พันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเกิดจากการออกซิเดชันของซิสเทอีน 2 โมเลกุล ดังสมการ



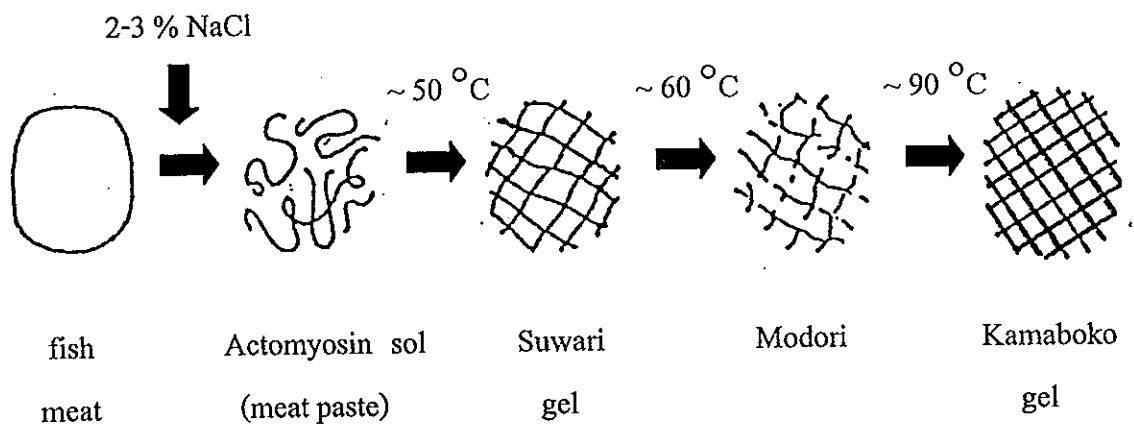
ในกระบวนการให้ความร้อน พันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุล (intramolecular) สามารถเปลี่ยนเป็นพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุล (intermolecular) พันธะไดซัลไฟด์จะเกิดมากขึ้นที่อุณหภูมิสูง (80 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า) เมื่อเทียบกับอุณหภูมิต่ำ การออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮดริล เป็นพันธะไดซัลไฟด์จะเริ่มต้นอย่างช้าๆ ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส (Tsukamasa *et al.*, 1993) นอกจากพันธะไดซัลไฟด์แล้ว พันธะโควาเลนต์ที่มีบทบาทสำคัญต่อความแข็งแรงของเจลคือ พันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในซูริมิคือ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (Tsukamasa and Shimizu, 1990; Seki *et al.*, 1990)

เนื้อปลาบดที่ผสมเกลือสามารถเสียดตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ระยะหนึ่งในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส เจลซูริมิสามารถเก็บกักน้ำไว้ในโมเลกุลโปรตีนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรโฟบิก พันธะไฮโดรเจน และพันธะโควาเลนต์ชนิดที่ไม่ใช่ไดซัลไฟด์

ดังรูปที่ 3 (Suzuki, 1981) Kamath และคณะ (1992) พบว่า เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส มีบทบาทสำคัญต่อการเซตตัวดังกล่าว

เมื่อให้ความร้อนกับแอคโตไมโอซินโซลจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าโครงสร้างของเจลถูกทำลาย ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า โมโดริ (modori) (รูปที่ 3) อัตราการเกิดโมโดริขึ้นกับชนิดของปลา และอัตราการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อภายใน เจล เอนไซม์โปรตีนเนสในกล้ามเนื้อปลามีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายไมโอซินทำให้ เจลที่ได้มีลักษณะอ่อนตัว เอนไซม์โปรตีนเนสที่สำคัญเช่น คาเซปซิน L (An *et al.*, 1997) เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเนส (Su *et al.*, 1981)

เจลคามาโบโกะซึ่งมีลักษณะยืดหยุ่น เกิดขึ้นเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (ดังรูป ที่ 3) ในช่วงนี้โมเลกุลของโปรตีนไมโอไฟบริลจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างแข็งแรงกว่าโครงสร้างเจลซูวารี การจับตัวหรือการเรียงตัวจะเกิดพันธะไฮโดรเจนหรือพันธะไฮโดรโฟบิก (Suzuki, 1981)

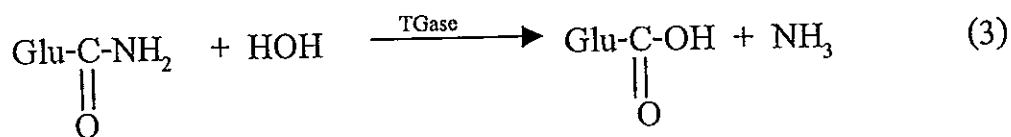
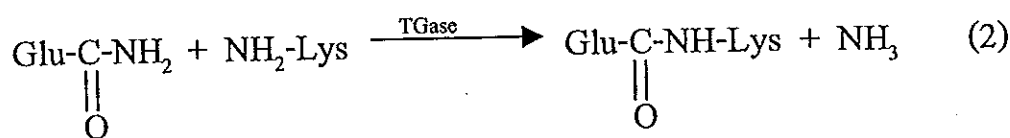
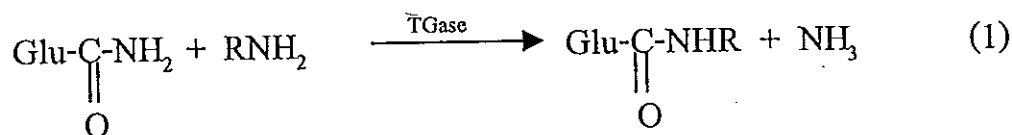


รูปที่ 3 ขั้นตอนการเกิดเจลคามาโบโกะ
ที่มา : Suzuki (1981)

3. เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

3.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส เป็นเอนไซม์ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลา ซึ่งมีหมู่ซีสเทอีนที่บริเวณเร่ง (active site) และมีความแตกต่างในแต่ละเนื้อเยื่อทำให้มีชื่อที่แตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปใช้คำว่า ทรานส์กลูตามิเนส (Folk, 1980) เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส มีหมู่ซีสเทอีนที่ช่วยให้เกิดปฏิกิริยากับ γ -carboxamide ของกลูตามีน เกิดเป็น γ -glutamyl thioester และปลดปล่อยแอมโมเนีย หลังจากนั้น γ -glutamyl thioester จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนเกิดเป็นพันธะ isopeptide หรือพันธะ γ -glutamyl polyamine (Greenberg *et al.*, 1991 ; สุธรวัดน์ เบญจกุล และ วรณพ วิเศษสงวน, 2541) ในกรณีที่ไม่มีเอมีน น้ำสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่เอซิล (acyl) เป็นผลให้กลูตามีนเปลี่ยนเป็นกรดกลูตามิก (Folk and Chung, 1973) (รูปที่ 4) นอกจากนี้กลุ่ม primary amino ที่มีส่วนไลซีน หรือ โพลีเอมาย สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับส่วนปลายของกลูตามีนเกิดเป็นพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ระหว่างโปรตีน หรือ γ -glutamyl polyamine เป็นผลให้เกิดพันธะโควาเลนต์ที่มีความคงตัวและทนต่อการย่อยสลาย (Greenberg *et al.*, 1991) เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสก่อให้เกิดการเชื่อมโยงเกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ทั้งในและนอกโมเลกุล (Folk and Chung, 1973)



รูปที่ 4 การทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในสถานะที่มีตัวร่วมทำปฏิกิริยา
ต่างๆ กัน

(1) ปฏิกิริยาการย้ายหมู่ acyl โดยมีหมู่ primary amine เป็นตัวรับ

(2) การเกิดพันธะเชื่อมโยงระหว่างกลูตามีนกับไลซีนในโปรตีน

(3) ปฏิกิริยา deamidation โดยมีน้ำเป็นตัวร่วมปฏิกิริยา

ที่มา : สุทรวัฒน์ เบญจกุล และ วรณพ พิเศษสงวน (2541)

3.2 ปัจจัยที่ส่งเสริมและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

จากการศึกษาคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากแหล่งต่างๆ พบว่า เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสทำงานได้ดีในช่วงพีเอชประมาณ 5-8 อุณหภูมิที่เหมาะสมไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส และสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูง (Greenberg *et al.*, 1991) Jiang และ Lee (1992) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ Factor XIII อยู่ในช่วง 25-55 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารเคมีต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงหมู่ซัลไฮดริล เช่น *N*-ethylmaleimide (NEM) *p*-chloromercuribenzoic (*p*CMB) แสดงในตารางที่ 2 (Ando *et al.*, 1989; Nowasd *et al.*, 1994)

ตารางที่ 2 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

สารยับยั้ง	BTGase (%)	GTGase(%)
None	100	100
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	111	109
<i>p</i> -chloromercuribenzoic (<i>p</i> CMB)	56	2
<i>N</i> -ethylmaleimide (NEM)	10	25
Monoiodoacetic acid (MIA)	76	3
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	111	106

ที่มา: Ando และคณะ (1989)

BTGase : เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์

GTGase : เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากตับของ Guinea pig

เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่สกัดได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลาต้องการแคลเซียมไอออนในการเร่งปฏิกิริยา แตกต่างจากเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ซึ่งไม่ต้องการแคลเซียมไอออนในการเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้เนื่องจากบนโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสไม่มีตำแหน่งสำหรับจับกับแคลเซียมไอออน แคลเซียมไอออนอาจช่วยยึดสับสเตรทและโครงสร้างของเอนไซม์และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาโดยตรง (สุทรวัดน์ เบญจกุล และ วรณพ วิเศษสงวน, 2541) Lorand (1986) รายงานว่า แคลเซียมไอออนมีความจำเป็นต่อการเปลี่ยน Factor XIII zymogen ไปเป็น Factor XIII และมีผลในการเปลี่ยนโครงสร้างของเอนไซม์เพื่อให้หมู่เร่งปฏิกิริยาสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น Kuraishi และคณะ (1996) กล่าวว่า เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่สกัดจากตับของ Guinea pig ต้องการแคลเซียมไอออนสำหรับการทำงานกระตุ้นการทำงาน ในขณะที่เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ไม่ต้องการแคลเซียมไอออนสำหรับกระตุ้นการทำงาน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของแคลเซียมไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

ความเข้มข้นของ แคลเซียมคลอไรด์	GTGase (%)	BTGase (%)
0 mM	0	100
1 mM	39	100
5 mM	100	99

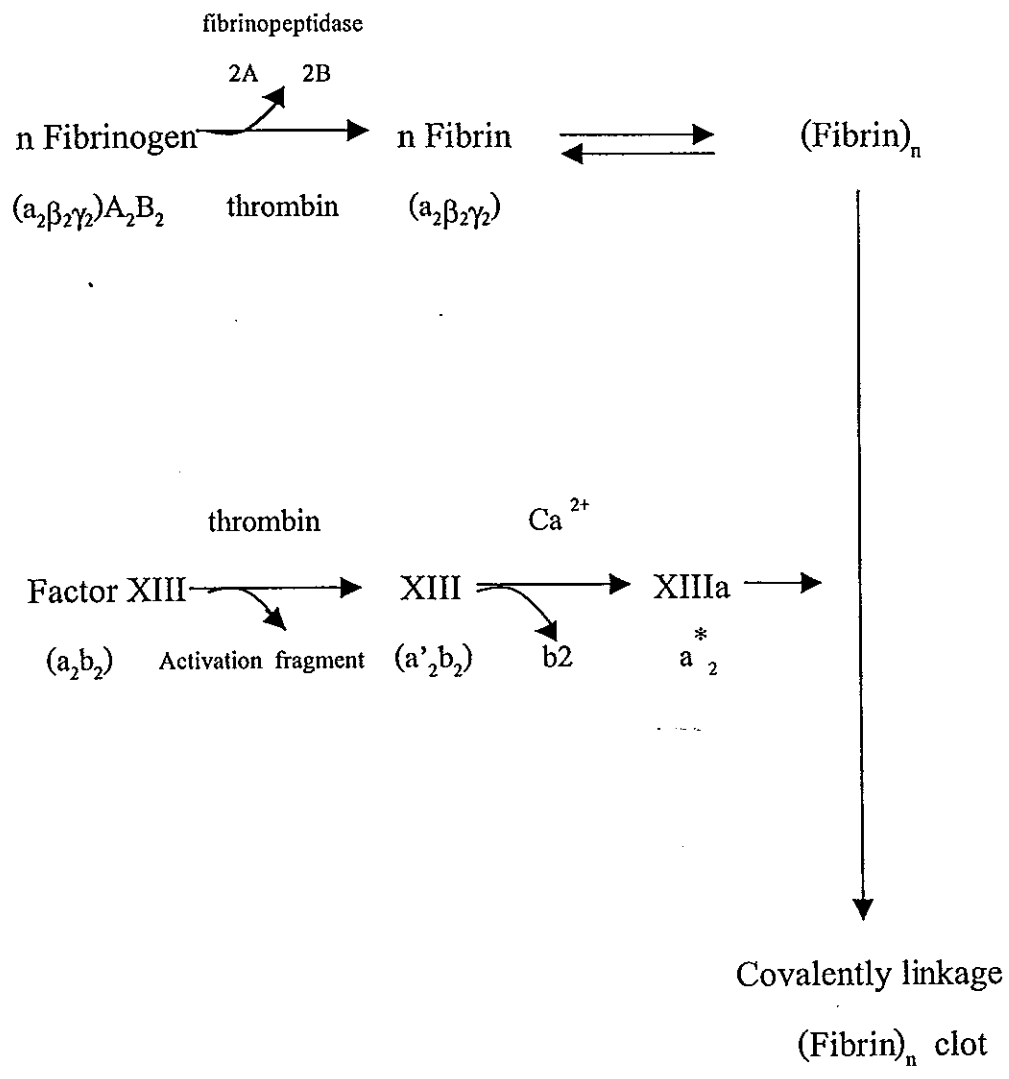
ที่มา : Kuraishi และคณะ (1996)

BTGase : เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์

GTGase : เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากตับของ Guinea pig

3.3 เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากพลาสมา (Factor XIII)

เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่พบในพลาสมา มีหน้าที่สำคัญในการทำให้เลือดแข็งตัวโดยการเชื่อมประสานของไฟบริน (fibrin) และ α_2 -antiplasmin โดยจะทำให้เกิดเป็นก้อนแข็งซึ่งสามารถต้านทานการไหลของเลือด (Tamaki and Aoki, 1985) การแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาชีวเคมีเป็นขั้นๆ แสดงในรูปที่ 5 การทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากพลาสมาต้องอาศัยทรอมบิน และแคลเซียมไอออน หรือสภาวะที่มีแคลเซียมไอออนมากพอ (De Backer-Royer *et al.*, 1992; Lorand, 1986; Shen and Lorand, 1983; Folk, 1980; Credo *et al.*, 1978) การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสโดยทรอมบินและแคลเซียมไอออนประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นแรกเป็นการตัดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน Arg₃₇-Gly₃₈ โดยทรอมบิน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ a-chain เป็นผลให้สูญเสียกรดอะมิโนที่ 37 ขั้นตอนนี้ไม่ต้องการแคลเซียมไอออน (Ichinose and Davie, 1988; Takahashi *et al.*, 1986; Takagi and Doolittle, 1974) ขั้นที่ 2 เกิดการแยกตัวของ b-chain ออกจาก a-chain เมื่อมีแคลเซียมไอออน ซึ่งแคลเซียมไอออนจะจับตัวกับ a-chain เป็นการกระตุ้นเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากพลาสมา (De Backer-Royer and Meurier, 1992; Greenberg *et al.*, 1991; Lorand, 1986; Folk, 1980; Takagi and Doolittle, 1974; สุทรวัดน์ เบญจกุล และ วรรณพ วิเศษสงวน, 2541) การแยกตัวของ b-chain จาก a-chain และการกระตุ้น a-chain สามารถทำได้ในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออนมากกว่า 100 มิลลิโมลาร์ (Lorand, 1986) เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากพลาสมามีปริมาณ 10×10^{-10} ถึง 10^{-7} โมลาร์ (Shen and Lorand, 1983)



รูปที่ 5 ปฏิกริยาการแข็งตัวของเลือด

ที่มา: Shen และ Lorand (1983)

3.4 เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในซูริมิและบทบาทต่อความแข็งแรงของเจล

เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในซูริมามีส่วนช่วยส่งเสริมให้เจลซูริมมีความแข็งแรง โดยจะเป็นตัวเชื่อมประสานโปรตีนไมโอซิน Tsukamasa และ Shimizu (1990) พบ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในกล้ามเนื้อปลา sardine Pacific mackerel red sea bream และ horse mackerel Araki และ Seki (1993) พบว่า เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในเนื้อ ปลาและซูริมิจากปลาหลายชนิด โดยมีระดับกิจกรรมแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของปลาดัง แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากเนื้อปลาและซูริมิชนิดต่าง ๆ

ชนิดของปลา	กิจกรรม (ยูนิต / กรัมของเนื้อปลา)
White croaker	2.41
Carp	1.14
Sardine	0.83
Walleye pollack	0.41
Chum salmon	0.33
Atka mackerel	0.23
Rainbow trout	0.10
Walleye pollack surimi	0.33
Chum salmon surimi	0.05

ที่มา : Araki และ Seki (1993)

Kumazawa และคณะ (1996) พบว่า ϵ -(γ -glutamyl) lysine เกิดขึ้นในไข่ปลา กล้ามเนื้อปลา และสัตว์ทะเลอีกหลายชนิด (ตารางที่ 5) ซึ่งเป็นพันธะที่เกิดขึ้นระหว่าง γ -carboxamide ของกลูตามีน และ ϵ -amino ของไลซีน พันธะดังกล่าวเป็นผลมาจากเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส Tsukamasa และคณะ (1993) ได้ศึกษาการเกิดพันธะ ϵ -(γ -glutamyl) lysine ในระหว่างการเช็ดตัวของเนื้อปลา sardine บด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น ปริมาณ ϵ -(γ -glutamyl) lysine สูงขึ้น

ตารางที่ 5 ปริมาณ ϵ -(γ -glutamyl) lysine ที่พบในกล้ามเนื้อปลาและสัตว์ทะเลชนิดต่างๆ

Samples	Scientific name	ϵ -(γ -glutamyl) lysine (mol/g of protein)	
		Egg	Muscles
Alaska pollock	<i>Theragra chalcogramma</i>	0.58	ND*
Flatfish	<i>Limanda herzensteini</i>	0.49	**
Flying fish	<i>Prognichthys agoo</i>	1.47	**
Herring	<i>Clupea pallasii</i>	0.91	0.23×10^{-2}
Horse mackerel	<i>Trachurus japonicus</i>	—	0.73×10^{-2}
Longfin smelt	<i>Spirinchrus lanceolatus</i>	1.21	**
Red salmon	<i>Oncorhynchus keta</i>	0.12	0.15×10^{-2}
Sandfish	<i>Arctoscopus japonicus</i>	1.12	**
Sardine	<i>Sardinops melanosticta</i>	0.26	ND
Seabass	<i>Lsteolabrax japonicus</i>	—	ND

ที่มา : Kumazawa และคณะ (1996)

*ND = non detect , **_ = no sampling

Wan และคณะ (1994) ศึกษาผลของความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสและการเกิดเจลซูริมิจากปลา walleye pollack พบว่า ความแข็งแรงของเจลสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนในช่วง 2-5 มิลลิโมลาร์ และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วตามด้วยการให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

เจลซูริมิที่แข็งแรงเกิดจากพันธะต่างๆ ที่เชื่อมยึดระหว่าง โมเลกุลหรือภายใน โมเลกุลของโปรตีนกล้ามเนื้อโดยเฉพาะไมโอซิน พันธะที่พบในเจลส่วนใหญ่เป็นพันธะไฮโดรเจนและพันธะไฮโดรโฟบิก (Park *et al.*, 1994; Hamada, 1992) โดยที่พันธะไดซัลไฟด์ และพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine จะช่วยส่งเสริมให้เจลมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Sakamoto *et al.*, 1994; Seguro *et al.*, 1995) เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสมีบทบาทสำคัญในการเชื่อมประสาน myosin heavy chain (MHC) ทำให้เพิ่มความแข็งแรงของเจล (Seguro *et al.*, 1995; Araki and Seki, 1993; Funatsu *et al.*, 1993; Kamath *et al.*, 1992) การเชื่อมประสานโปรตีนไมโอซินโดยเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงของเจลซูริมิจากปลา hoki (Kimura *et al.*, 1991) ซูริมิจากปลา Alaska pollack (Nowsad *et al.*, 1993; Tsukamasa and Shimizu, 1990; Nishimoto *et al.*, 1987; Numakura *et al.*, 1985) ซูริมิจากปลา walleye pollack (Funatsu and Arai, 1991) และซูริมิจากปลา sardine (Funatsu *et al.*, 1993)

Jiang และ Lee (1992) ได้ทำการศึกษาการแยกบริสุทธิ์ Factor XIII จากพลาสมาเลือดหมู พบว่า Factor XIII ประกอบด้วยโปรตีน 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน (MW~75,000) ต้องการทรอมบินและแคลเซียมอิออนในการกระตุ้นการทำงาน เมื่อนำ Factor XIII มาใช้ในเนื้อปลา mackerel บด พบว่า Factor XIII สามารถเชื่อมประสาน MHC ของปลา mackerel เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส และความแข็งแรงของเจลเนื้อปลาบดเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) เมื่อเติม Factor XIII ร้อยละ 0.2 ที่พีเอช 7

Seymour และคณะ (1997) ได้แยกส่วนพลาสมาเลือดวัว ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสคือ α_2 -แมคโครโกลบูลิน (แฟรกชัน IV-1) และส่วนที่มีเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (แฟรกชัน I-S) และเมื่อนำแฟรกชันที่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสและส่วนที่มีเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสมาเติมในซูริมิจากปลา Pacific whiting ร้อยละ 0.1 พบว่า แฟรกชันทั้งสองสามารถเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิ

4. เอนไซม์โปรตีเอส

4.1 ชนิดของเอนไซม์โปรตีเอส

โปรตีเอส (Proteolytic enzymes) เป็นเอนไซม์ไฮโดรไลติกชนิดหนึ่งซึ่งเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยปกติเอนไซม์เหล่านี้สังเคราะห์ในรูปโปรเอนไซม์ (proenzyme) หรือ ไซโมเจน (zymogen) ซึ่งอยู่ในสภาพที่ไม่ทำงาน (Whitaker, 1994) โปรตีเอสอาจเป็นโปรตีนซึ่งประกอบด้วยสายโซ่ของโพลีเปปไทด์เพียงสายเดียว โดยทั่วไปจะประกอบด้วยกรดอะมิโนระหว่าง 100-300 หน่วย และมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 13,000-35,000 ดาลตัน ตัวอย่างเช่น carboxypeptidase A (Adler-Nissen, 1986) นอกจากนี้โปรตีเอสบางชนิดอาจจะประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) หลายหน่วยรวมกัน เช่น อัลคาไลน์โปรตีเอสจากกล้ามเนื้อปลา ซึ่งประกอบด้วย 4 หน่วยที่แตกต่างกัน (α β γ δ) (Makinodam *et al.*, 1982) เอนไซม์โปรตีเอสสามารถจำแนกชนิดตามอนุโมลที่บริเวณเร่ง (active site) ซึ่งประกอบด้วย โปรตีเอสชนิดซีรีน โปรตีเอสชนิดซิสเตอีน โปรตีเอสชนิดแอสปาร์ติก และ โปรตีเอสชนิดเมทัลโล (Whitaker, 1994)

โปรตีเอสชนิดซีรีน

โปรตีเอสชนิดซีรีนเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ประกอบด้วยหมู่เซريلอยู่บริเวณเร่ง เอนไซม์เหล่านี้ถูกยับยั้งด้วย Diisopropyl fluorophosphate (DFP) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุโมลเซريل (seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์มีหมู่อิมิดาโซล (imidazole) อยู่ที่บริเวณเร่ง เอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์จำพวกเอนโคเปปติเดส ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชมากกว่า 7 (พีเอช 7-11) ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ซบทีลิซิน และ เอนไซม์ทริปซิน เป็นต้น (Loffler, 1986)

โปรตีเอสชนิดซิสเตอีน

โปรตีเอสชนิดซิสเตอีนเป็นเอนไซม์กลุ่มที่มีหมู่ซัลไฟด์ไรล (sulfhydryl group ; -SH) ในบริเวณเร่ง และอาจมีหมู่อิสติดิล (histidyl) รวมอยู่ด้วย ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในช่วงเป็นกลาง คือ พีเอช 6.0-7.5 ทนความร้อนได้ถึง 60-80 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งได้โดยสารที่ทำหน้าที่บล็อกหมู่ซัลไฟด์ไรล ทำให้อนุโมลที่บริเวณ

เร่งสูญเสียการทำงาน เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด เช่น ป่าเปน จากมะละกอ นอกจากนี้เอนไซม์เหล่านี้อาจพบได้ในสัตว์น้ำ เช่น คาเรปซิน (Greene and Babitt, 1990)

เอนไซม์โปรตีเอสชนิดแอสพาร์ติก

เอนไซม์โปรตีเอสชนิดแอสพาร์ติกเป็นเอนไซม์ที่มีช่วงการทำงานเหมาะสมที่พีเอชเป็นกรด (พีเอช < 7) โดยทั่วไปเอนไซม์กลุ่มนี้มีช่วงพีเอชเหมาะสมในช่วงพีเอช 2-4 เอนไซม์กลุ่มนี้มีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ อยู่ที่บริเวณเร่งโดยเฉพาะกรดแอสพาร์ติก เอนไซม์มีความจำเพาะกับกรดอะมิโนที่เป็นสารประกอบวงแหวน (aromatic amino acid) เอนไซม์ในกลุ่มนี้เช่น เรนิน (Webster, 1969) ไคโมซิน และ เปปซิน (Loffler, 1986)

โปรตีเอสชนิดเมทซ์ล

โปรตีเอสชนิดเมทซ์ลเป็นเอนไซม์ที่มีอิออนของโลหะภายในโมเลกุลของเอนไซม์ โดยมีบทบาทช่วยในปฏิกิริยาย่อยสลายกล่าวคือ อยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ โดยทั่วไปเอนไซม์ชนิดนี้เป็นชนิดเอกโซเปปติเดส (exopeptidase) มีกิจกรรมสูงสุดในช่วงพีเอชเป็นกลาง (พีเอช 5.6-7.5) อาจเรียกว่า นิวทรัลโปรตีเอส (neutral protease)

4.2 เอนไซม์โปรตีเอสในซูริมิและบทบาทต่อการอ่อนตัวของเจล

เอนไซม์โปรตีเอสที่พบในปลามาจาก 3 แหล่ง ที่สำคัญคือ เอนไซม์ที่พบตามธรรมชาติในตัวปลา เอนไซม์ที่มาจากปรสิตที่อาศัยอยู่ในตัวปลา และเอนไซม์โปรตีเนสจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลา (Morrissey *et al.*, 1993) เอนไซม์โปรตีเนสพบในส่วนของเหลวภายในเซลล์หรืออาจจับอยู่กับเซลล์ของอวัยวะภายในหรือกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำ (Kolodzieska and Sikorski, 1996) ซึ่งเอนไซม์โปรตีเอสที่สำคัญที่สามารถพบในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำแสดงดังตารางที่ 6 เอนไซม์โปรตีเอสเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนตัว เช่น กล้ามเนื้อปลา croaker ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเนส ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิและพีเอช 60 องศาเซลเซียส และ 7.5 ตามลำดับ (Su *et al.*, 1981) Boye และ Lanier (1988) พบอัลคาไลน์โปรตีเนสในปลา Atlantic menhaden (*Brevortia tyrannus*) ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ พีเอช 7.5-8.0 กล้ามเนื้อปลา arrowtooth flounder ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์คาเรปซิน L และ

คาเธปซิน D ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 55-60 องศาเซลเซียส (Greene and Babbitt, 1990) ในกล้ามเนื้อปลา tilapia ประกอบด้วยเอนไซม์คาเธปซิน D (Jiang *et al.*, 1990) Martone และคณะ (1991) สามารถแยกเอนไซม์ที่มีลักษณะคล้ายเอนไซม์ทริปซิน (trypsin-like proteinase) ได้จากกล้ามเนื้อปลา Peruvian hake (*Merluccius hubbsi*)

ซูริมิที่ผลิตจากปลา Pacific whiting มีลักษณะเจลที่อ่อนตัวอันเป็นผลมาจากการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อโดยกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดเอนโดเปปติเดส (endopeptidases) (An *et al.*, 1994; Chang-Lee *et al.*, 1990; Morrissey *et al.*, 1993) Morrissey และคณะ (1993) รายงานว่าปลา Pacific whiting มีกิจกรรมการย่อยสลายของโปรตีนสูงเมื่อเทียบกับปลาชนิดอื่น เช่น ปลา red snapper ปลา rockfish และปลา squawfish ซึ่งส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลซูริมิลดลง คาเธปซิน L ในปลา Pacific whiting มีกิจกรรมสูงที่ 55 องศาเซลเซียส และทนอุณหภูมิได้ถึง 70 องศาเซลเซียส (Chang-Lee *et al.*, 1990; Porter *et al.*, 1993)

ตารางที่ 6 เอนไซม์โปรตีเอสที่พบในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำ

Enzyme	Optimum pH*	Optimum Temperature* (°C)	Effect on muscle protein	
Cysteine Protease	Calcium-active protease	6.9-7.5	30	Cleavage of myofibrillar protein to TCA soluble fragments, Degradation of cytoskeletal proteins
	Cathepsin L	5.0-5.6	40-50	Hydrolysis of most myofibrillar proteins, cleaving of telopeptide from type I collagen
	Cathepsin B	5.7-6.0		Slight hydrolysis of myosin, actin, nebulin, and troponin T
	Cathepsin C	6.0-6.5		
Serine protease	Heat-activate Cysteine protease	6.0-6.5	55-65	Hydrolysis of myosin
	Heat-activate Trypsin like protease	6.2-8.0	50-60	Hydrolysis of myosin
	Multicatalytic protease	6.0-10.0	60-65	Hydrolysis of myosin
	Other trypsin like protease	8.0-9.0	37-40	Hydrolysis of isolated myosin, disintegration of the cytoskeletal and contractile element of intact myofibril
Metallo-protease	Neutral protease	7.2	40	
	Heat stable alkaline Protease	7.0-8.0	50	Hydrolysis of type I collagen, gellation, and other cytoskeletal matrix proteins
	Myosinase I and II	7.0	40	Hydrolysis of myosin

*The range of data regards activity with different proteins and synthetic substrates

ที่มา : Kolodziejska and Sikorski (1996)

4.3 การใช้สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสในซูริมิ

เนื่องจากมีความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสและคุณภาพที่ลดลงของเจลซูริมิ จึงมีการศึกษาแนวทางในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อปรับปรุงคุณภาพของเจล การใช้สารเติมแต่งที่มีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสามารถป้องกันการเกิดโมโคริได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารเหล่านี้สามารถปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของซูริมิและควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสชนิดทนความร้อนซึ่งย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ (An *et al.*, 1994; Chang-Lee *et al.*, 1990; Morrissey *et al.*, 1993)

Morrissey และคณะ (1993) รายงานว่า โปรตีนจากปลาสมาลือคัว ไข่ขาว และแป้งมันฝรั่งสามารถยับยั้งการเกิดโมโคริในเจลซูริมิจากปลา Pacific whiting Chang-Lee และคณะ (1990) พบว่า การเติมไข่ขาวผง โบวินซีรัมอัลบูมิน ในซูริมิจากปลา Pacific whiting สามารถยับยั้งการเกิดโมโคริและให้คุณภาพของซูริมิที่ดี Weerasinghe และคณะ (1995) พบว่า โปรตีนปลาสมาลือคัวสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ปาเปนได้สูงสุด โปรตีนเวย์ แป้งมันฝรั่ง และไข่ขาว ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งรองลงมา ส่วนไข่ขาวสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินได้สูงสุด โปรตีนจากปลาสมาลือคัว แป้งมันฝรั่ง และโปรตีนเวย์ ให้การยับยั้งรองลงมา Hamann และคณะ (1990) รายงานว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากปลาสมาลือคัว และไข่ขาวสามารถป้องกันการเกิดโมโคริ และเพิ่มความเค็มและความเครียดในเจลซูริมิที่บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส และให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส โดยพบว่าสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส คือ α_2 -แมคโครโกลบูลิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในปลาสมาลือคัว นอกจากนี้ยังพบว่า α_2 -แมคโครโกลบูลิน ในโปรตีนปลาสมาลือคัวสามารถยับยั้งโมโคริในซูริมิจากปลา New Zealand hoki และ Alaska pollock (Hamann *et al.*, 1990)

α_2 -แมคโครโกลบูลิน เป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส ที่พบในปลาสมาลือคัวมีความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยโปรตีน 4 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 720 กิโลดาลตัน (Harpel and Brower, 1983; Sottrup-Jensen *et al.*, 1983) Barrett และ Starkey (1973) พบว่า α_2 -แมคโครโกลบูลิน เป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสพวกซีรีน ซีสเทอีน คาร์บอกซิล และเมทัลโล α_2 -แมคโครโกลบูลิน สามารถเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิ

จากปลา arrowtooth flounder (Wasson *et al.*, 1992) ชูริมิจากปลา hoki (Lorier and Aitken, 1991)

การใช้สารเติมแต่งอาหารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวในชูริมิ มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การเพิ่มต้นทุนการผลิตและอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส เช่น กลิ่น และรสในผลิตภัณฑ์ที่เปลี่ยนแปลงไป การใช้พลาสติกมาจากเลือดวัวอาจทำให้เกิดกลิ่นที่ผิดปกติ การใช้ไข่ขาวผงซึ่งมีราคาแพงทำให้เกิดกลิ่นไขในชูริมิ ส่วนการใช้แป้งมันฝรั่งทำให้เกิดสีที่ผิดปกติ (Akazawa *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1993)

วัตถุประสงค์

- 1 ศึกษาการแยกและตรวจสอบสมบัติบางประการของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสและเอนไซม์ทรานส์กลูทามิเนสจากพลาสมาเลือดหมู
- 2 ศึกษาการประยุกต์ใช้และสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส และเอนไซม์ทรานส์กลูทามิเนสที่แยกจากพลาสมาเลือดหมูในซูริมิ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัสดุดิบ

1.1 เลือดหมู จากโรงฆ่าสัตว์เทศบาลนครหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่

จังหวัดสงขลา

1.2 ปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) จาก บริษัท แปซิฟิกแปรรูปสัตว์น้ำ จำกัด
อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

1.3 ชูริมิจากปลาตาหวาน (เกรด A) จาก บริษัท แปซิฟิกแปรรูปสัตว์น้ำ จำกัดอำเภอ
เมือง จังหวัดสงขลา

2. เคมีภัณฑ์

2.1 เคมีภัณฑ์เกรดวิเคราะห์ (analytical grade) สำหรับการเตรียมพลาสติกเลือดหมู
และการแยกส่วนองค์ประกอบของพลาสติก การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์
โปรตีนเอส การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส การวิเคราะห์คุณภาพของ
ชูริมิ และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.2 เอนไซม์ปาเปน และเอนไซม์ทริปซิน จากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์

1. เครื่องโฮโมจิไนส์ ยี่ห้อ NISSEI รุ่น AM-8 ประเทศมาเลเซีย

2. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ SORVALL รุ่น RC-B plus
ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ยี่ห้อ EPPENDORF รุ่น 5415 C ประเทศ
เยอรมัน

4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-16001 ประเทศ
ออสเตรเลีย
5. เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ ยี่ห้อ JASCO รุ่น FP-750 ประเทศญี่ปุ่น
6. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส ยี่ห้อ STABLE MICRO SYSTEM รุ่น TA-XT 2I
ประเทศอังกฤษ
7. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ SARTORIUS รุ่น BP 2100S ประเทศ
เยอรมัน และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น AB 204
ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
8. ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น Mini-PROTEAN II ประเทศสหรัฐ
อเมริกา
9. เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ JUKI รุ่น JP 7100 F ประเทศไต้หวัน
10. เครื่องพีเอชมิเตอร์ ยี่ห้อ DENVER INSTRUMENT รุ่น 15 ประเทศสหรัฐ
อเมริกา
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น W350 ประเทศเยอรมัน
12. เครื่องต้บผสม ยี่ห้อ NATIONAL รุ่น MK-K77 ประเทศญี่ปุ่น
13. เครื่องกวนชนิดแม่เหล็กไฟฟ้า ยี่ห้อ KIKA Labortechnik รุ่น RO 10 power
ประเทศเยอรมัน
14. เครื่องทำแห้งชนิด Freeze-Dryer ยี่ห้อ FTSystems รุ่น Dura-Top™ μ p
ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการทดลอง

1 การเตรียมพลาสติกจากเลือดหมู

เก็บตัวอย่างเลือดหมู จากโรงฆ่าสัตว์เทศบาลนครหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และเติมสารป้องกันการตกตะกอน (โซเดียมซิเตรทร้อยละ 3.8) ร้อยละ 10 แช่เลือดหมูในน้ำแข็ง และขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ คณะอุตสาหกรรมเกษตร นำมาเหยียงแยกที่ความเร็วรอบ 1,000xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ครั้ง ทำแห้งส่วนใสที่ได้ด้วย freeze dryer และเก็บรักษาพลาสติกมาผงที่ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปใช้

2 ศึกษาผลของพลาสติกต่อความแข็งแรงของเจลซูริมิ

2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเซตตัวของซูริมิที่เติมพลาสติกมา

2.1.1 อุณหภูมิของการเซตตัว

นำซูริมิปลาตาหวานแช่แข็งมาทำละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร เติมเกลือร้อยละ 2.5 จากนั้นสับผสมด้วยเครื่องสับผสมที่อุณหภูมิต่ำ (ต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมพลาสติกมาร้อยละ 0.5 ลงในซูริมิ สับผสมต่ออีก 3 นาที บรรจุส่วนผสมในไส้โพลีไวนิลคลอไรด์ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.1.2 เวลาของการเซตตัว

นำซูริมิปลาตาหวานแช่แข็งมาทำละลาย หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เติมเกลือ เติมพลาสติกมาร้อยละ 0.5 ลงในซูริมิ สับผสม และบรรจุส่วนผสมในไส้เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ข้อ 2.1.1) เป็นเวลาต่างๆ คือ 30 60 90 และ 120 นาที

2.1.3 ความเข้มข้นของพลาสติกมา

นำซูริมิปลาตาหวานแช่แข็งมาทำละลาย หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เติมเกลือ เติมพลาสติกมาที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ร้อยละ 0 0.5 1 2 และ 3 สับผสม และบรรจุส่วนผสมในไส้เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมตามข้อ 2.1.1 และ 2.1.2

2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดเจล

เตรียมเจลซูริมิที่ผ่านการแช่ตัว เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 2.1.2 และ 2.1.3 แล้วให้ความร้อนกับเจลที่ผ่านการแช่ตัวที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.3 ตรวจสอบคุณภาพของเจลซูริมิ (ภาคผนวก ก)

ตรวจสอบคุณภาพของเจลซูริมิที่ได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 ดังนี้

- วัดค่าความขาว โดยเครื่องวัดสี ยี่ห้อ JUKI
- วัดความแข็งแรงของเจล โดยตรวจสอบแรงการเจาะทะลุ (breaking force) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (deformation) ด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส
- วัดการละลายของเจลในสารละลายต่างๆ โดยวิธีของ Roussel และ Cheftel (1990)
- ตรวจสอบการอุ้มน้ำของเจล โดยวัดปริมาณของเหลวจากการบีบอัด ตามวิธีของ Wierbicki และ Deatherage (1958)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) แต่ละสิ่งทดลองทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองแบบ DMRT (Duncan 's multiple range test) (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2531) คัดเลือกสภาวะในการเกิดเจลที่ดีที่สุด

3 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสของพลาสมาเลือดหมู

3.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสของพลาสมาเลือดหมู

ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดต่างๆ ของพลาสมาที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (ร้อยละ 0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 และ 4) ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสโดยตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือภายหลังการเติมพลาสมา โดยใช้สับสเตรทที่แตกต่างกัน (ภาคผนวก ค.) คือ

- ปาเปิน ใช้ $N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide (BANA) เป็น สับสเตรท (Barett and Kirshke, 1981)
- ทริปซิน ใช้ $N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanitide (BAPNA) เป็น สับสเตรท (Erlanger *et al.*, 1961)
- เอนไซม์จากเครื่องในปลา ใช้ เคซีน เป็นสับสเตรท (An *et al.*, 1994)

- เอนไซม์จากกล้ามเนื้อปลา ใช้เคซีน เป็นสับสเตรท (An *et al.*, 1994)

3.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง

ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาบด โดยเติมพลาสติกเม็ดหุ้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (ร้อยละ 0 1 2 และ 3) ในเนื้อปลาดาทาหวานบดที่ผ่านการล้างน้ำด้วยน้ำเย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) จำนวน 2 ครั้ง (อัตราส่วนเนื้อปลาบด : น้ำ เท่ากับ 1:3 (นน./ปริมาตร) และเนื้อปลาดาทาหวานบดที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจสอบเปปไทด์ที่เกิดจากการย่อยสลายตัวเอง ตามวิธีของ Morrissey และคณะ (1993) (ภาคผนวก ก4.) และตรวจรูปแบบโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE (12% running gel และ 4% stracking gel) ตามวิธีของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก ข.)

4 ศึกษาการแยกส่วนองค์ประกอบในพลาสติกเม็ดหุ้ และการตรวจสอบคุณสมบัติของแฟรกชัน

แยกส่วนประกอบที่มีกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสและ/หรือเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส ในพลาสติกโดยแยกเป็นแฟรกชันต่างๆ (ภาคผนวก จ.) ดังนี้

-แฟรกชัน I เตรียมโดย การตกตะกอนพลาสติกเม็ดหุ้ด้วยเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Cohn และคณะ (1946)

-แฟรกชัน I-S เตรียมโดยวิธีของ Seymour และคณะ (1997)

-แฟรกชัน II+III เตรียมโดย การตกตะกอนพลาสติกเม็ดหุ้ด้วยเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Cohn และคณะ (1946)

-แฟรกชัน IV เตรียมโดย การตกตะกอนพลาสติกเม็ดหุ้ด้วยเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 40 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 5.8 ตามวิธีของ Cohn และคณะ (1946)

-แฟรกชัน IV-1 เตรียมโดย การตกตะกอนพลาสติกเม็ดหุ้ด้วยเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 18 ที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 5.2 ตามวิธีของ Cohn และคณะ (1946)

แฟรกชันที่แยกได้ นำไปทำแห้งด้วย freeze dryer เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปใช้ ตรวจสอบสมบัติของแต่ละแฟรกชันดังนี้คือ

4.1 รูปแบบของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE (10% running gel และ 4% stacking gel) ตามวิธีของ Laemmli (1970)

4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแต่ละแฟรกชัน โดยวิธี MDC-incorporating activity assay ตามวิธีของ Lorand และคณะ (1971) (ภาคผนวก ก.)

คัดเลือกแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสสูงสุดและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสดังนี้

4.2.1 อุณหภูมิ

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส โดยตรวจสอบกิจกรรมของแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 5 15 35 45 55 และ 65 องศาเซลเซียส คัดเลือกอุณหภูมิที่ให้กิจกรรมสูงสุด

4.2.2 แคลเซียมไอออน

ศึกษาผลของแคลเซียมไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส ตรวจสอบกิจกรรมของแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 50 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิเหมาะสม (ข้อ 4.2.1)

4.3.3 สารยับยั้งการทำงาน

ศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส โดยใช้สารยับยั้งต่างๆ คือ *N*-ethylmaleimide (NEM) เข้มข้นร้อยละ 0.1 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เข้มข้นร้อยละ 1 และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เข้มข้นร้อยละ 1 ตรวจสอบกิจกรรมของแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในสถานะที่มีสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิเหมาะสมจาก (ข้อ 4.2.1)

4.3 ตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนสของแต่ละแฟรกชัน

ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนสชนิดต่าง ๆ ของแต่ละแฟรกชันที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.5 1 2 และ 3 เช่นเดียวกับข้อ 3.1 คัดเลือกแฟรกชันที่มีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนสสูงสุด ศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิ โดยบ่มแฟรกชัน

ที่มีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส ที่อุณหภูมิ 37 40 45 50 55 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วด้วยน้ำผสมน้ำแข็ง (อุณหภูมิ 0-2 องศาเซลเซียส) ตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน และ ปาเปน (ตามข้อ 3.1)

5 การประยุกต์ใช้แฟรกชันที่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสและแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในเจลซูริมิ

5.1 แฟรกชันที่มีกิจกรรมของของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส

นำซูริมิปลาตาหวานแช่แข็งมาทำละลาย แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เติมเกลือร้อยละ 2.5 จากนั้นสับผสมด้วยเครื่องสับผสมภายใต้อุณหภูมิต่ำ (ต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมแฟรกชันที่มีกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสสูงสุด ซึ่งผ่านการทำแห้งด้วย freeze dryer ในซูริมิที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 0 0.1 0.2 และ 0.5) สับผสมต่ออีก 3 นาที บรรจุส่วนผสมในไส้โพลีไวนิลคลอไรด์ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร) และบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ตรวจสอบคุณภาพเจล ซูริมิเช่นเดียวกับข้อ 2.3

5.2 แฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

5.2.1 ความเข้มข้นของแฟรกชัน

นำซูริมิปลาตาหวานแช่แข็งมาทำละลาย แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เติมเกลือแล้วเติมแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสสูงสุดซึ่งผ่านการทำแห้งด้วย freeze dryer ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 0 0.1 0.2 0.3 และ 0.5) ซึ่งบ่มในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิโน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชันที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในซูริมิ สับผสมต่ออีก 3 นาที บรรจุใส่ (เช่นเดียวกับข้อ 5.1) และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบคุณภาพของเจลซูริมิเช่นเดียวกับข้อ 2.3

5.2.2 ผลของแคลเซียมอิออน

ศึกษาผลของแคลเซียมอิออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชันที่เติมในซูริมิ โดยบ่มแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ความเข้มข้นเหมาะสม (จากข้อ 5.2.1) ด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นแตกต่าง ๆ คือ

0 50 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ และทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาเติมในซูริมิที่เติมเกลือร้อยละ 2.5 และ สับผสม (เช่นเดียวกับข้อ 5.1) และป่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบคุณภาพของเจล ซูริมิเช่นเดียวกับข้อ 2.3

5.2.3 ผลของการเติมทรอมบิน (thrombin)

ศึกษาผลของทรอมบินต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส โดย ป่มแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ความเข้มข้นเหมาะสม (จากข้อ 5.2.1) ด้วยทรอมบินที่ความเข้มข้น 50 100 และ 150 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และ แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม (ข้อ 5.2.2) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 10 นาที จากนั้นนำมาเติมในซูริมิที่เติมเกลือร้อยละ 2.5 สับผสมและบรรจุได้ (เช่น เดียวกับข้อ 5.1) แล้วป่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบคุณภาพของเจลซูริมิเช่นเดียวกับข้อ 2.3

5.2.4 ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของเจลซูริมิที่เติมแฟรกชันที่มีกิจกรรมของ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาพที่มีแคลเซียมคลอไรด์ที่ความ เข้มข้นเหมาะสม (ข้อ 5.2.2) ทรอมบินที่ความเข้มข้นเหมาะสม (ข้อ 5.2.3) โดยใช้ gradient SDS-PAGE (5-10% running gel และ 4% stacking gel) ตามวิธี Laemmli (1970)

บทที่ 3

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

1 การศึกษาผลของพลาสติกหุ้มต่อความแข็งแรงของเจลซูริมิ

1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเซตตัว

จากการศึกษาอุณหภูมิของการเซตตัวต่อคุณภาพของเจลซูวาริ (เจลซูริมิที่ผ่านการเซตตัวแต่ไม่ผ่านการให้ความร้อน) ที่เติมพลาสติกหุ้มร้อยละ 0.5 โดยใช้อุณหภูมิของการเซตตัวต่างๆ คือ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 6ก) พบว่า เจลซูวาริที่ได้มีค่าแรงเจาะทะลุ (breaking force) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (deformation) ที่แตกต่างกัน ($P < 0.05$) เจลซูวาริที่เติมพลาสติกหุ้มร้อยละ 0.5 และเซตตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุ เท่ากับ 829.35 ± 19.63 กรัม และ 14.99 ± 0.01 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเจลซูวาริที่เตรียมโดยการเซตตัวที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ($P < 0.05$) ส่วนระยะทางก่อนเจาะทะลุไม่แตกต่างกันกับเจลซูวาริที่เตรียมโดยการเซตตัวที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ($P > 0.05$)

เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กับเจลซูวาริที่ผ่านการเซตตัวที่สภาวะต่างๆ (รูปที่ 6ข) พบว่า เจลซูวาริที่เซตตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยการให้ความร้อน มีค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุสูงสุด ($P < 0.05$) โดยมีค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุเท่ากับ 1260.02 ± 11.49 กรัม และ 14.99 ± 0.01 มิลลิเมตร สำหรับเจลซูริมิที่เตรียมโดยการให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ที่ไม่ผ่านการเซตตัวมีค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุต่ำสุด ($P < 0.05$) Lanier และคณะ (1982) รายงานว่า การเก็บโซลที่อุณหภูมิต่ำ (25-40 องศาเซลเซียส) หรือการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงจะมีผลให้เจลที่ได้มีความแข็งแรง เนื่องจากการคลายตัวของโปรตีนเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และสามารถจัดเรียงตัวระหว่างโปรตีนที่คลายตัวออกอย่างเป็นระเบียบ โครงสร้างของเจลจึงมีความต่อเนื่องและเป็นระเบียบ (Foegeding *et al.*, 1986) เมื่อเปรียบเทียบสมบัติของเจลซูวาริและเจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อน พบว่า เจลซูวาริมีค่าแรงเจาะทะลุ

และระยะทางก่อนเจาะทะลุต่ำกว่าเจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อน ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงก่อให้เกิดการสูญเสียสภาพของโปรตีนและก่อให้เกิดการจับรวมตัวของโปรตีน (aggregation) โดยพันธะชนิดต่างๆ เช่น พันธะไฮโดรโฟบิก พันธะไดซัลไฟด์ และพันธะชนิดอื่นๆ ซึ่งส่งเสริมให้เจลซูวารีที่ได้มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Lanier *et al.*, 1988) เจลซูวารีที่ผ่านการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ชนิดที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์ (non-disulfide covalent bond) ซึ่งมีบทบาทในระยะเวลาการเชื่อมตัวของซูวารี พันธะที่สำคัญได้แก่ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่พบในเนื้อปลา (Kumazawa *et al.*, 1996) และปลาสมาลือคหมู (Jiang and Lee, 1992) เมื่อปริมาณ ϵ -(γ -glutamyl)lysine เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลซูวารีเพิ่มขึ้น (Lee *et al.*, 1997) Jaing และ Lee (1992) พบว่า การเชื่อมตัวซูวารีจากปลา mackerel ที่เติม Factor XIII จากปลาสมาลือคหมู ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที สามารถเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูวารีได้ประมาณร้อยละ 60 Sakamoto (1995) พบว่า เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสช่วยทำให้เกิดการเชื่อมประสานของ MHC ในระหว่างการเชื่อมตัว

ความสามารถในการละลายของโปรตีนสามารถบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนระหว่างการเกิดเจล การละลายของเจลซูวารีซึ่งผ่านการเชื่อมด้วยที่อุณหภูมิต่างๆ และเจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในสารละลายต่างๆ แสดงดังรูปที่ 7 พบว่า ความสามารถในการละลายของเจลซูวารีและเจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อน ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ (S1) และสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 (S2) มีค่าต่ำกว่าร้อยละ 10 เนื่องจากโดยทั่วไปโปรตีนไมโอไฟบริลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาสามารถละลายในสารละลายเกลือที่มี ionic-strength สูง (S1) แต่จากการทดลองพบว่า การละลายของโปรตีนลดลงอย่างเด่นชัด ทั้งนี้เนื่องจากการจับเรียงตัวของโปรตีนซึ่งเป็นผลจากการเชื่อมตัวหรือการเชื่อมตัวร่วมกับการให้ความร้อน (Suzuki, 1981; Rodger and Wilding, 1990) การเติมโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต ร้อยละ 1 ในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 (S3) พบว่า ความสามารถในการละลายของเจลซูวารีทุกชุดการทดลองเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าร้อยละ 40 โดยชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความร้อนเพียงอย่างเดียวมีความสามารถในการละลายสูงถึงร้อยละ 65 โดยโซเดียมโคเค

ซัลเฟตมีประสิทธิภาพในการทำลายพันธะไฮโดรฟอบิกในเจล เนื่องจากโซเดียมโคเค ซัลเฟตเป็น anionic detergent ซึ่งสามารถจับกับส่วนไฮโดรฟอบิกของโปรตีน ส่งผลให้ ความแข็งแรงของพันธะระหว่างส่วนไฮโดรฟอบิกลดลง (Park *et al.*, 1994) ดังนั้นการให้ ความร้อนกับเจลซูริมีมีผลเร่งการเกิดพันธะไฮโดรฟอบิกซึ่งมีบทบาทต่อความแข็งแรง เมื่อเติมยูเรีย 8 โมลาร์ ลงในสารละลาย (S4) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายพันธะ ไฮโดรฟอบิก และพันธะไฮโดรเจน มีผลทำให้ความสามารถในการละลายของทุกชุดการ ทดลองเพิ่มขึ้นถึงประมาณร้อยละ 75 โดยเจลซูริมีที่เชื่อมตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทั้งชุดการทดลองที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนมีความสามารถในการละลายประมาณ ร้อยละ 69 ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ($P < 0.05$) และเมื่อเติมเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล ร้อยละ 2 ลงในสารละลาย (S5) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ เนื่องจากเบต้า-เมอแคปโตเอธานอลสามารถทำลายพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างซิสเทอีน (Roussel and Cheftel, 1990) แต่ไม่สามารถทำลายพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะได ซัลไฟด์ จากการทดลอง พบว่า สารละลาย S5 ทำให้การละลายของทุกชุดการทดลองเพิ่ม ขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ S4 ซึ่งบ่งชี้บทบาทของพันธะไดซัลไฟด์ในเจลซูริมี ชุดการทดลองต่างๆ เจลซูริมีที่เชื่อมตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทั้งชุดการทดลองที่ผ่าน และไม่ผ่านการให้ความร้อน มีความสามารถในการละลายใน S5 ประมาณร้อยละ 85 ต่ำ กว่าชุดการทดลองอื่นๆ ($P < 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเจลซูริมีที่เชื่อมตัวที่อุณหภูมิ 35 องศา เซลเซียส ประกอบด้วยพันธะชนิดอื่นที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระยะ เชื่อมตัว เช่น ϵ -(γ -glutamyl)lysine โดยเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

จากการศึกษาความขาวของเจลซูริมีที่เชื่อมตัวที่อุณหภูมิต่างๆ และเจลซูริมีที่ผ่าน การให้ความร้อน พบว่า เมื่ออุณหภูมิการเชื่อมตัวสูงขึ้นค่าความขาวของเจลซูริมีเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) เจลซูริมีที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที มี ความขาวไม่แตกต่างกัน ($P < 0.05$) (ตารางที่ 7) ดังนั้นความร้อนมีบทบาทโดยตรงต่อ ความขาว ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนมีผลต่อการสูญเสียธรรมชาติของโปรตีน โดยเฉพาะ โปรตีนที่ประกอบด้วยรงควัตถุ เช่น ไมโกลบิน หรือฮีโมโกลบิน นอกจากนี้ความร้อนอาจ มีผลเร่งการเกิดออกซิเดชันของรงควัตถุในซูริมี ทำให้สีของรงควัตถุจางลง ส่งผลให้ความ ขาวเพิ่มขึ้น ดังนั้นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (90 องศาเซลเซียส) จึงเพียงพอสำหรับ

0.5 ชั่วโมงในการศึกษาครั้งนี้ 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส
เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย และอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส
เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย

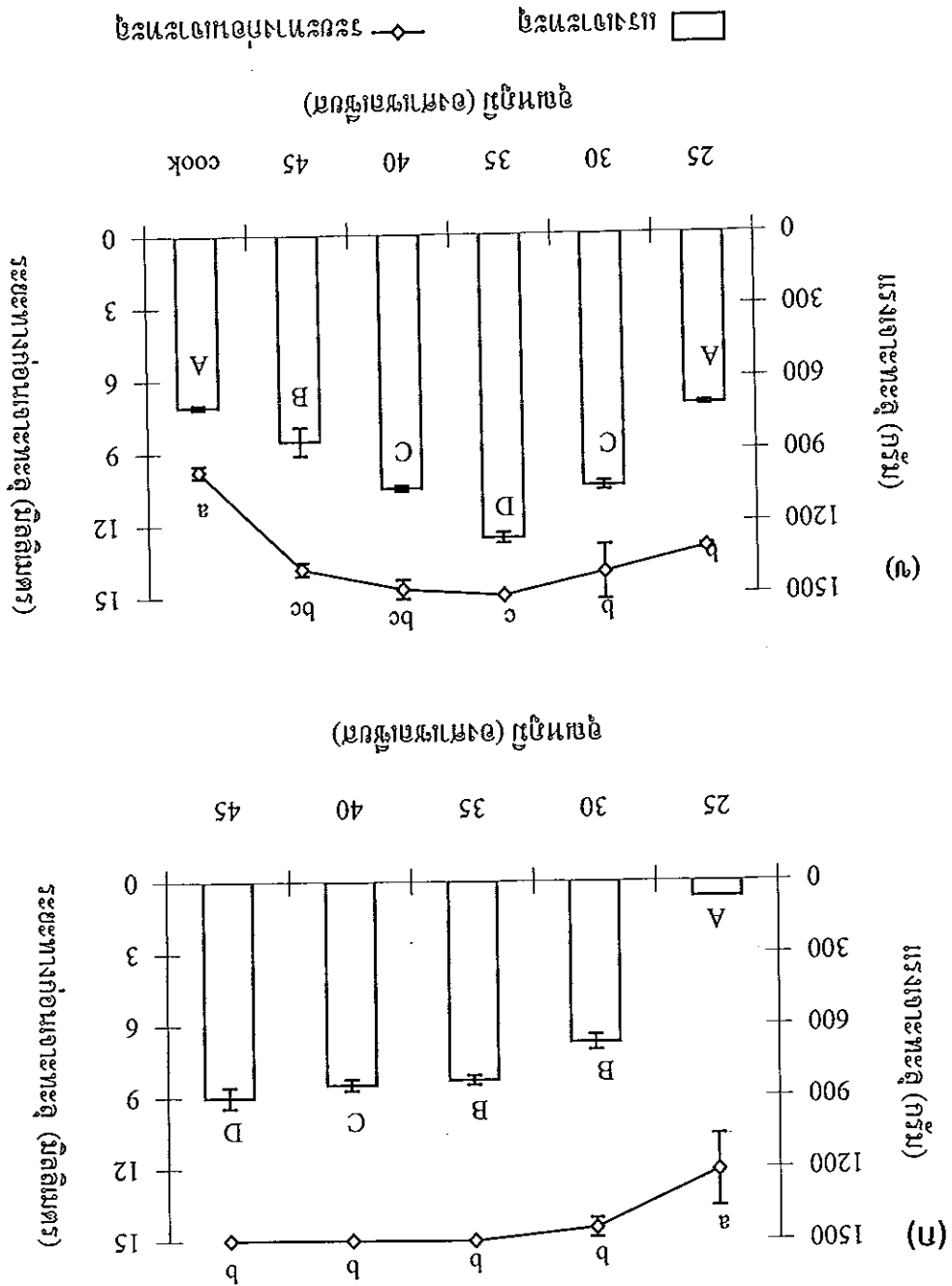
อุณหภูมิ

โดยทั่วไปแล้วเชื้อราและแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส
กว่าที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส
เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย และอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส
เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย (P > 0.05) เมื่อเปรียบเทียบความชื้นสัมพัทธ์
ของเชื้อราและแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส
กับอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส (P < 0.05) ปริมาณของเชื้อราและแบคทีเรียที่เจริญเติบโต
จากการปนเปื้อนในอากาศ (P > 0.05) (ตารางที่ 7) โดยพบว่า เชื้อราและแบคทีเรียที่เจริญเติบโต
ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส
มีความชื้นสัมพัทธ์ (expressible moisture) พบว่า เชื้อราและแบคทีเรียที่เจริญเติบโต
ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส

การเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส (P > 0.05)

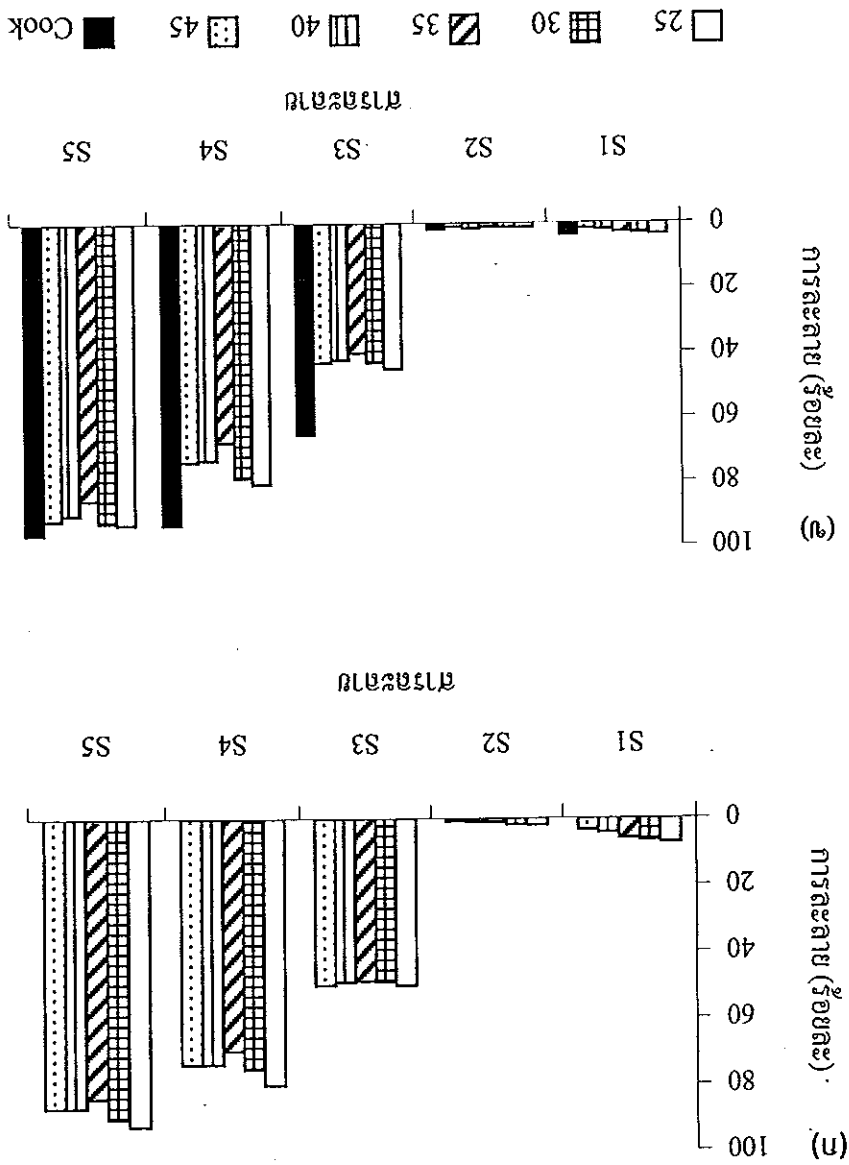
การเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส

รูปที่ 6 แรงจลน์และระยะทางก่อนเจาะทะลุของเงาเข็มที่เติมพลาสมาตามเล็อกหม้อหุงต้ม
 และ 0.5 และเซตหม้อหุงต้มชนิดต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ก) เกล็ดข้าว (ข) เกล็ดข้าว
 ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
 * อักษร a b c A B C D และ E ที่หม้อบนซ้ายใช้สำหรับภาวะการให้ความร้อนเดี่ยว
 กับ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)



รูปที่ 7 การละลายของเจลาตินที่อุณหภูมิคงที่ตามอัตราส่วนของ 0.5 และ 1% ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ก) เจลาติน (ข) เจลาตินที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

S1 : 0.6 M KCl
 S2 : 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8
 S3 : S2 + 1% SDS (w/v)
 S4 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea
 S5 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea + 2% βME (v/v)



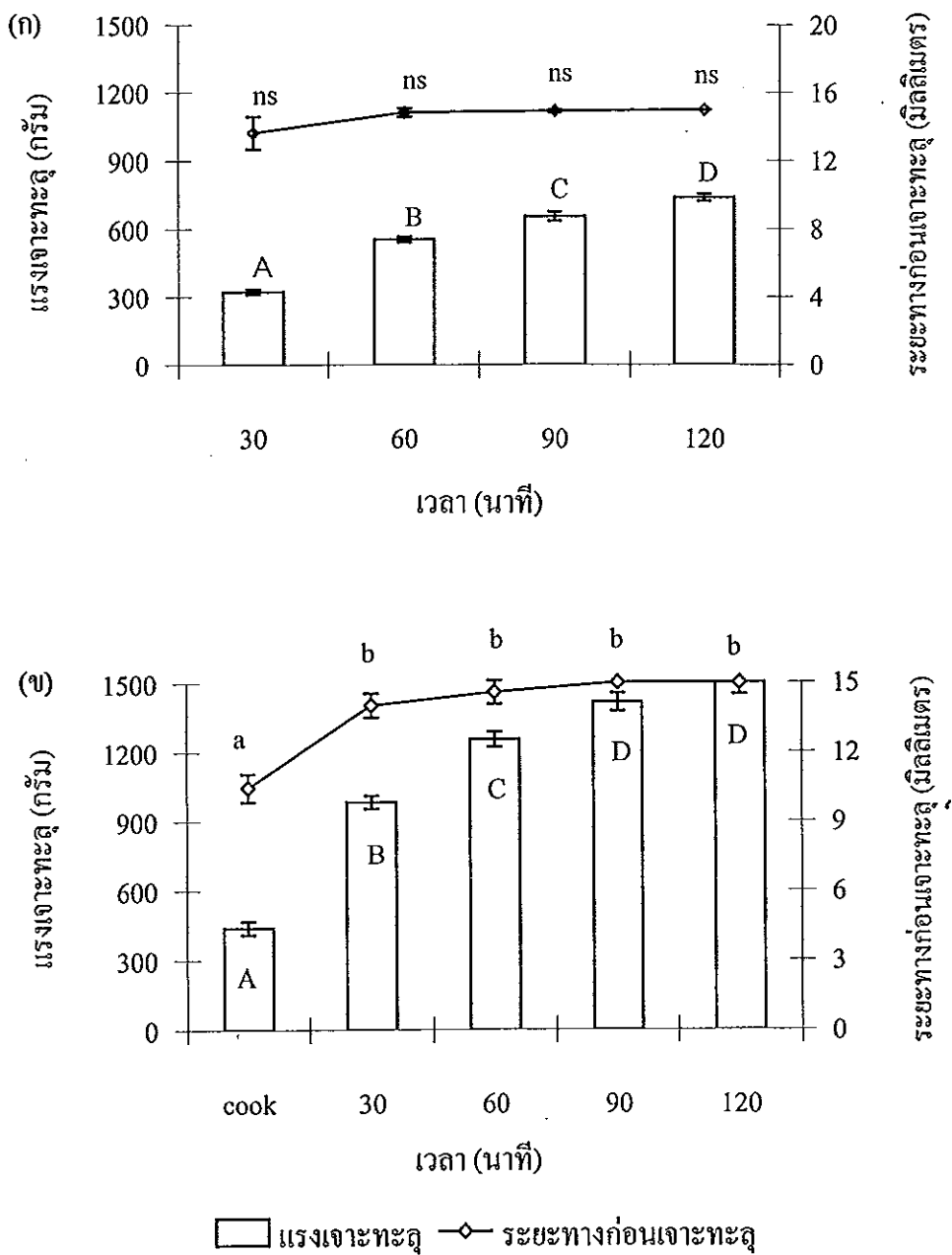
ตารางที่ 7 ความยาว และปริมาณของเมล็ดจากการนับของเมล็ดข้าวที่เก็บตาม
 เล็ดหรือยอด 0.5 และเมล็ดข้าวที่เก็บตาม 2 ช่วงในช่วง
 และในการปลูกข้าว

เลด	อุณหภูมิเมล็ดข้าว	ความยาว	ปริมาณของเมล็ดจากการนับ
เลดข้าว	25	54.69±0.40 ^a	2.27±0.16 ^{bc}
	30	56.34±0.15 ^b	2.51±0.14 ^c
	35	56.29±0.10 ^b	2.00±0.08 ^{ab}
	40	66.84±0.06 ^c	1.95±0.15 ^a
	45	69.15±0.08 ^d	1.94±0.05 ^a
เลดข้าวที่ผ่าน	25	70.35±0.32 ^{ns}	2.34±0.10 ^b
การปลูกข้าว	30	69.29±0.12 ^{ns}	1.84±0.10 ^a
(90 องศาเซลเซียส	35	69.33±0.41 ^{ns}	1.68±0.21 ^a
20 นาที)	40	69.23±0.42 ^{ns}	1.74±0.30 ^a
	45	70.88±0.66 ^{ns}	1.74±0.14 ^a
เลดที่ปลูกข้าว 90°C	-	69.74±0.18 ^{ns}	2.08±0.05 ^{ab}

หมายเหตุ ตัวอักษร a b c d และ ns ที่เหมือนกันในสมมติฐานภายใต้สภาวะการให้
 ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)
 * ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

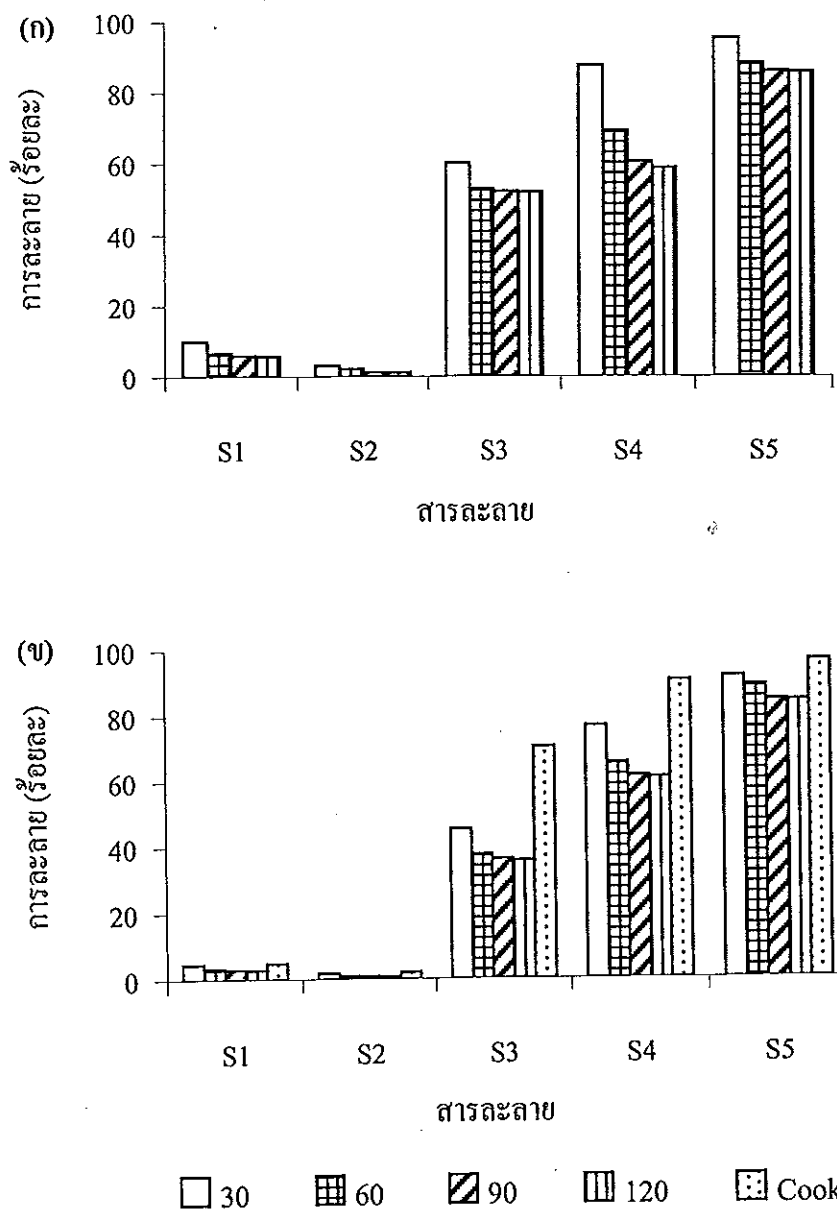
1.2 เวลาที่เหมาะสมในการแช่ตัว

จากการศึกษาเวลาในการแช่ตัวของซูริมิที่เติมพลาสมาเลือดหมูเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 60 90 และ 120 นาที พบว่า เมื่อเวลาในการแช่ตัวเพิ่มขึ้น ค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) ทั้งเจลซูวาริที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (รูปที่ 8) เจลซูวาริที่ผ่านการแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที มีค่าแรงเจาะทะลุสูงกว่าเจลซูวาริที่แช่ตัวเป็นเวลา 30 และ 60 นาที ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับตัวอย่างที่แช่ตัวเป็นเวลา 120 นาที ($P > 0.05$) โดยค่าระยะทางก่อนเจาะทะลุไม่แตกต่างกันเมื่อเวลาการแช่ตัวเพิ่มขึ้น ($P > 0.05$) (รูปที่ 8ก) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการแช่ตัวเป็นเวลา 30 หรือ 60 นาทีไม่เพียงพอสำหรับการเกิดพันธะต่างๆ โดยเฉพาะพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ที่มีบทบาทให้เจลซูวาริมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Jaing และ Lee (1992) พบว่า ซูริมิจากปลา mackerel ที่เติมพลาสมาเลือดหมูเข้มข้นร้อยละ 0.2 แช่ตัวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 60 นาที มีค่าความแข็งแรงของเจลสูงสุด Gilleland และคณะ (1997) พบว่า เจลซูริมิจากปลา Alaska pollock ที่แช่ตัวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีผลให้ปริมาณพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine เพิ่มขึ้น Wan และคณะ (1994) พบว่า เจลซูริมิที่แช่ตัวเป็นเวลาเพิ่มขึ้นทำให้ความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น ดังนั้นการแช่ตัวเป็นเวลานานมีผลให้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสทั้งจากกล้ามเนื้อปลาและจากพลาสมาเลือดหมูที่เติมลงในซูริมิสามารถเร่งปฏิกิริยาการถ่ายเทหมู่เอซิลจากกลูตามีนไปยังไลซีนเกิดเป็นพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine มากขึ้น จึงมีผลเพิ่มค่าแรงเจาะทะลุ แม้จะไม่มีผลต่อค่าระยะทางก่อนเจาะทะลุ สำหรับเจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่า ให้ผลเช่นเดียวกับเจลซูวาริที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน โดยมีค่าแรงเจาะทะลุเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนส่งเสริมการจับเรียงตัวของโปรตีนโดยพันธะชนิดต่างๆ โดยเฉพาะพันธะไฮโดรโฟบิกและพันธะไดซัลไฟด์เพิ่มขึ้นทำให้ความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น (รูปที่ 8ข)



รูปที่ 8 แรงเงาะทะเล และระยะทางก่อนเงาะทะเลของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกหุ้มร้อยละ 0.5 และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ (ก) เกล็ดหอย (ข) เกล็ดหอยที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที * อักษร a b ns A B C และ D ที่เหมือนกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เมื่อพิจารณาการละลายของเจลซูวารีที่เติมพลาสมาเลือดหมูเข้มข้นร้อยละ 0.5 เช็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 60 90 และ 120 นาที (รูปที่ 9) พบว่า การละลายมีแนวโน้มลดลง เมื่อเวลาในการเช็ดตัวเพิ่มขึ้น โดยการละลายในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ (S1) และสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 (S2) ของทุกชุดการทดลองทั้งเจลซูวารีที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน มีค่าต่ำกว่าร้อยละ 10 สำหรับการเติมโซเดียมโคเดซิลซัลเฟตในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (S3) ทำให้ความสามารถในการละลายทุกชุดการทดลองเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มยูเรีย 8 โมลาร์ (S4) ทำให้ความสามารถในการละลายทุกชุดการทดลองเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยเจลซูวารีที่เช็ดตัวเป็นเวลา 30 นาที มีการละลายในสารละลายทุกชนิดสูงกว่าเจลซูวารีที่เช็ดตัวเป็นเวลานานขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการเช็ดตัวที่เวลาดสั้นมีผลให้การจัดเรียงตัวของโปรตีนโดยพันธะชนิดต่างๆ เกิดขึ้นได้น้อยกว่าที่เวลาการเช็ดตัวนานขึ้น เมื่อทดสอบการละลายในสถานะที่มีการเติมเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (S5) พบว่า ความสามารถในการละลายของเจลซูวารีเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาการเช็ดตัวนานขึ้น แต่เจลที่ผ่านเช็ดตัวเป็นเวลา 90 และ 120 นาที มีค่าการละลายไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ดังนั้นพันธะไดซัลไฟด์จึงมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความแข็งแรงของเจลเมื่อเวลาการเช็ดตัวนานขึ้น อย่างไรก็ตามเจลซูวารีและเจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อนไม่สามารถละลายทั้งหมดในสารละลาย S5 ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีพันธะโควาเลนต์ชนิดที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์ เจลซูวารีที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนมีค่าการละลายใน S5 ต่ำสุด เมื่อผ่านการเช็ดตัวเป็นเวลา 90 และ 120 นาที ทั้งนี้เนื่องจากขณะเช็ดตัวเป็นเวลาเพียงพอมีผลให้ปริมาณพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลาและพลาสมาเลือดหมูที่เติมลงไปในซูวารีจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเช็ดตัวนานขึ้น (Tsukamasa *et al.*, 1993)



รูปที่ 9 การละลายของเจลลูรีนที่เติมพลาสติกมาเลอคหุมูร้อยละ 0.5 และเชื้อดักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ (ก) เจลลูวารี (ข) เจลลูวารีที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

S1 : 0.6 M KCl

S2 : 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8

S3 : S2 + 1% SDS (w/v)

S4 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea

S5 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea + 2% β ME (v/v)

สำหรับความขาวของเจลซูวารีที่เซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที มีค่าไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) (ตารางที่ 8) ยกเว้นการเซ็ดตัวเป็นเวลา 30 นาที ซึ่งให้ความขาวแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ ดังนั้นเวลาการเซ็ดตัวจึงมีบทบาทต่อความขาวน้อยกว่าอุณหภูมิการเซ็ดตัว (ตอนที่ 1.1) ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการสูญเสียสภาพของโปรตีนหรือรงควัตถุ ส่วนปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาในการเซ็ดตัวเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2) เนื่องจากขณะการเซ็ดตัวปริมาณพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเซ็ดตัวนานขึ้น ก่อให้เกิดเป็นโครงข่ายเจลที่แข็งแรงซึ่งเก็บน้ำไว้ในโครงข่ายได้สูงขึ้น (Tsukamasa *et al.*, 1993; Kumazawa *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามเจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อนมีปริมาณของเหลวจากการบีบอัดไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$)

จากผลการทดลองบ่งชี้ว่า การเซ็ดตัวของซูริมิจากปลาตาหวานที่เติมพลาสติกออกซาลูมูร็อยละ 0.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ให้คุณภาพของเจลใกล้เคียงกับเจลที่เซ็ดตัวเป็นเวลา 120 นาที จึงเลือกการเซ็ดตัวที่เวลา 90 นาที สำหรับการศึกษาดังต่อไปนี้

ตารางที่ 8 ความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกเม็ดกลม หมูร้อยละ 0.5 และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่าน และไม่ผ่านการให้ความร้อน

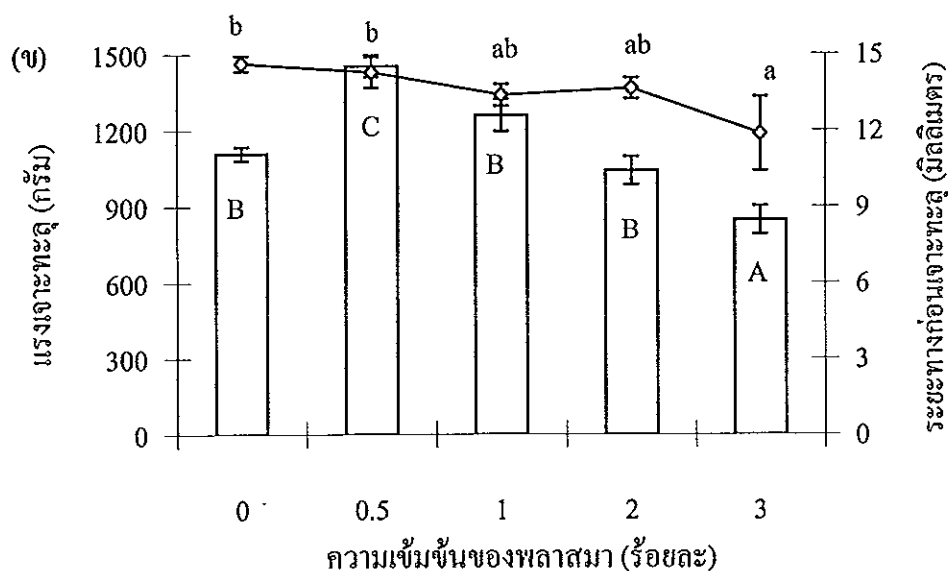
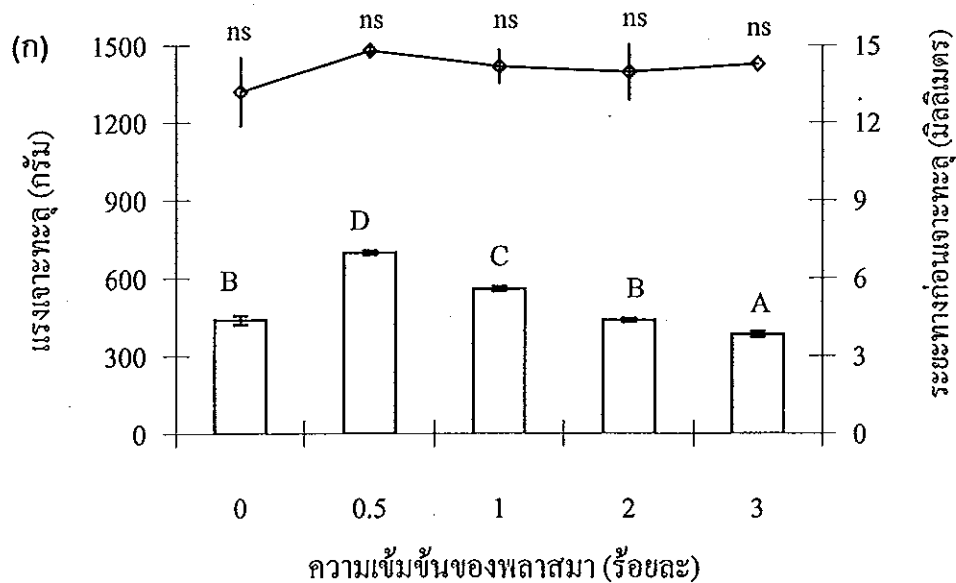
เจล	เวลาการแช่ตัว (นาที)	ความขาว	ปริมาณของเหลวจาก การบีบอัด (ร้อยละ)
เจลซูริมิ	30	50.03±0.24 ^a	1.91±0.24 ^c
	60	51.07±0.24 ^b	1.73±0.04 ^{bc}
	90	51.18±0.25 ^b	1.67±0.06 ^{ab}
	120	50.94±0.24 ^b	1.50±0.11 ^a
เจลซูริมิที่ผ่านการ ให้ความร้อน (90 องศาเซลเซียส 20 นาที)	30	64.40±0.33 ^{bc}	2.01±0.11 ^{ns}
	60	64.23±0.19 ^{ab}	2.06±0.25 ^{ns}
	90	63.90±0.31 ^a	2.03±0.13 ^{ns}
	120	63.80±0.30 ^a	2.00±0.15 ^{ns}
เจลซูริมิที่ให้ความร้อนโดยตรง (90 องศาเซลเซียส 20 นาที)	-	64.90±0.21 ^c	2.07±0.04 ^{ns}

หมายเหตุ ตัวอักษร a b c และ ns ที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

1.3 ความเข้มข้นของพลาสมาที่เหมาะสมต่อการเซ็ตตัว

จากการศึกษาเจลซูวารีที่เติมพลาสมาเลือดหมูที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 2 และ 3 และเซ็ตตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที พบว่า ค่าแรงเจาะทะลุของเจลซูวารีมีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$) ซึ่งระยะทางก่อนเจาะทะลุไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) (รูปที่ 10ก) โดยพบว่า เจลซูวารีที่เติมพลาสมาเลือดหมูที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ให้ค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุสูงกว่าชุดที่ไม่มีการเติมพลาสมาและเจลซูวารีที่เติมพลาสมาเลือดหมูที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ ($P < 0.05$) สำหรับเจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อนพบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน (รูปที่ 10ข) โดยการเติมพลาสมาเลือดหมูที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น มีผลให้ค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุลดลง ($P < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในโครงข่ายของเจลนั้นประกอบด้วยโปรตีนของพลาสมาที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาตกลง นอกจากนี้การเติมโปรตีนพลาสมาเลือดหมูในปริมาณที่มากเกินไป มีผลขัดขวางการเชื่อมประสานระหว่างโปรตีนไมโอไฟบริลทำให้ความสามารถในการเกิดโครงข่ายของเจลของโปรตีนไมโอไฟบริลลดลง ดังนั้นการเติมพลาสมาเลือดหมูในปริมาณมากไม่สามารถเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูวารี แต่มีผลให้คุณภาพเจลซูวารีลดลง Jiang และ Lee (1992) พบว่า ความแข็งแรงของเจลจากเนื้อปลา mackerel บด เพิ่มขึ้น เมื่อเติม Factor XIII เข้มข้นร้อยละ 0.2 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.2 มีผลให้ความแข็งแรงของเจลเนื้อปลาบดลดลง Tsai และคณะ (1996) รายงานว่า การเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ในเนื้อปลา mackerel บด ที่ความเข้มข้น 0.34 ยูนิตต่อกรัมเนื้อปลาบด ให้ความแข็งแรงของเจลเนื้อปลาบดเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่า 0.34 ยูนิตต่อกรัมเนื้อปลาบด พบว่า ความแข็งแรงของเนื้อปลาบดลดลง

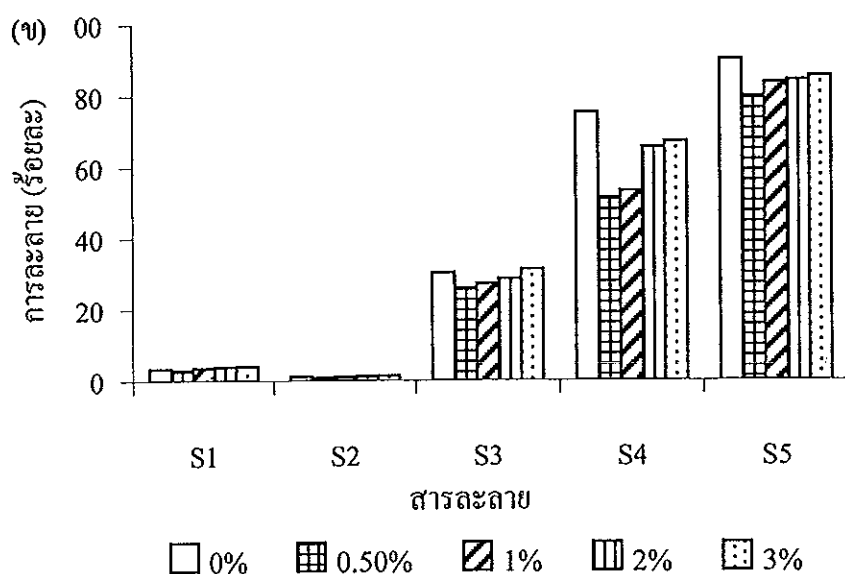
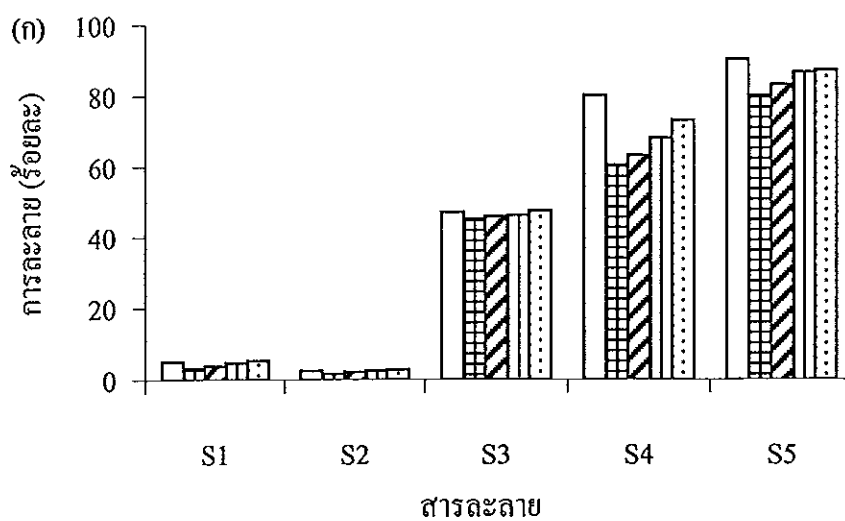


□ แรงเจาะทะลุ ◊ ระยะทางก่อนเจาะทะลุ

รูปที่ 10 แรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกชนิดหมูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (ก) เจลซูวารี (ข) เจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

* อักษร a b ns A B C และ D ที่เหมือนกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

การละลายของเจลซูวาริที่เติมพลาสติกหุ้มที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แสดงในรูปที่ 11 การละลายของเจลทุกชุดการทดลองในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ และทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ มีค่าไม่เกินร้อยละ 10 โดยการละลายจะสูงขึ้นเมื่อเติมโซเดียมโคเดซิลซัลเฟตร้อยละ 1 ในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (S3) ส่วนการเติมยูเรีย 8 โมลาร์ (S4) นั้นทำให้การละลายเพิ่มสูงขึ้น โดยพบว่า เจลซูวาริที่เติมพลาสติกหุ้มที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการเติมพลาสติกหุ้มในปริมาณสูงขึ้นไปมีผลขัดขวางการจับเรียงตัวของโปรตีนไมโอไฟบริลด้วยพันธะต่างๆ เมื่อพิจารณาการละลายของเจลซูวาริในสารละลาย S5 พบว่า เจลซูวาริที่เติมพลาสติกหุ้มร้อยละ 0.5 ให้การละลายต่ำสุด ซึ่งแสดงว่า เจลซูวาริประกอบด้วยพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเจลซูวาริที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน พบว่า เจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อนมีความสามารถในการละลายต่ำกว่าเจลซูวาริที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนในชุดการทดลองที่เติมพลาสติกหุ้มที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการให้ความร้อนอาจทำให้โปรตีนจับรวมตัวกันด้วยพันธะต่างๆ เช่น พันธะไฮโดรโฟบิก และพันธะไดซัลไฟด์เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งจากการทดลองพบว่า เมื่อเติมเบต้า-เมอแคปโตเอทานอลร้อยละ 2 ทำให้สัดส่วนการละลายของชุดการทดลองที่ผ่านการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน จากการทดลองเจลที่ผ่านการเติมพลาสติกหุ้มร้อยละ 0.5 มีความสามารถในการละลายในสารละลายต่างๆ ต่ำสุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกหุ้มความสามารถในการละลายจะเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าแรงเฉาะทะเลและระยะทางก่อนเฉาะทะเล ซึ่งมีค่าสูงสุดเมื่อการเติมพลาสติกหุ้มร้อยละ 0.5



รูปที่ 11 การละลายของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (ก) เจลซูวาริ (ข) เจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

S1 : 0.6 M KCl

S2 : 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8

S3 : S2 + 1% SDS (w/v)

S4 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea

S5 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea + 2% β ME (v/v)

เมื่อตรวจสอบความขาวของเจลซูวาริที่เติมพลาสติกมาเลือกหมูที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 2 และ 3 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (ตารางที่ 9) พบว่า ความขาวมีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$) การเติมพลาสติกมาเลือกหมูที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นค่าความขาวจะค่อยๆ ลดลงตามลำดับ แต่การเติมพลาสติกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-3 ให้ความขาวไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในพลาสติกเลือกหมูมีรงควัตถุ เช่น ไนโอโกลบิน ฮีโมโกลบิน และเม็ดเลือดปะปนอยู่ ดังนั้นรงควัตถุดังกล่าวอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของซูริมิได้ สำหรับเจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อน พบว่า เจลมีความขาวลดลงเมื่อเติมพลาสติกมาเลือกหมูที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) ส่วนปริมาณของเหลวจากการบีบอัดมีค่าใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูริมิที่เติมพลาสติกความเข้มข้นต่างๆ และแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน

เจล	ความเข้มข้นของ พลาสติก(ร้อยละ)	ความขาว	ปริมาณของเหลวจากการ บีบอัด (ร้อยละ)
เจลซูริมิ	0	63.31±0.09 ^c	1.00±0.26 ^a
	0.5	62.05±0.10 ^b	1.29±0.08 ^{ab}
	1	59.94±0.80 ^a	1.19±0.17 ^{ab}
	2	58.25±0.06 ^a	1.58±0.14 ^b
	3	58.67±0.36 ^a	1.21±0.16 ^{ab}
เจลซูริมิที่ผ่าน การให้ความร้อน (90 องศาเซลเซียส 20 นาที)	0	75.51±0.19 ^e	1.28±0.33 ^{ns}
	0.5	74.96±0.34 ^d	1.29±0.09 ^{ns}
	1	73.77±0.28 ^c	1.39±0.07 ^{ns}
	2	72.44±0.10 ^b	1.23±0.08 ^{ns}
	3	71.14±0.23 ^a	1.01±0.02 ^{ns}

หมายเหตุ ตัวอักษร a b c d e และ ns ที่เหมือนกัน ในสดมภ์เดียวกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

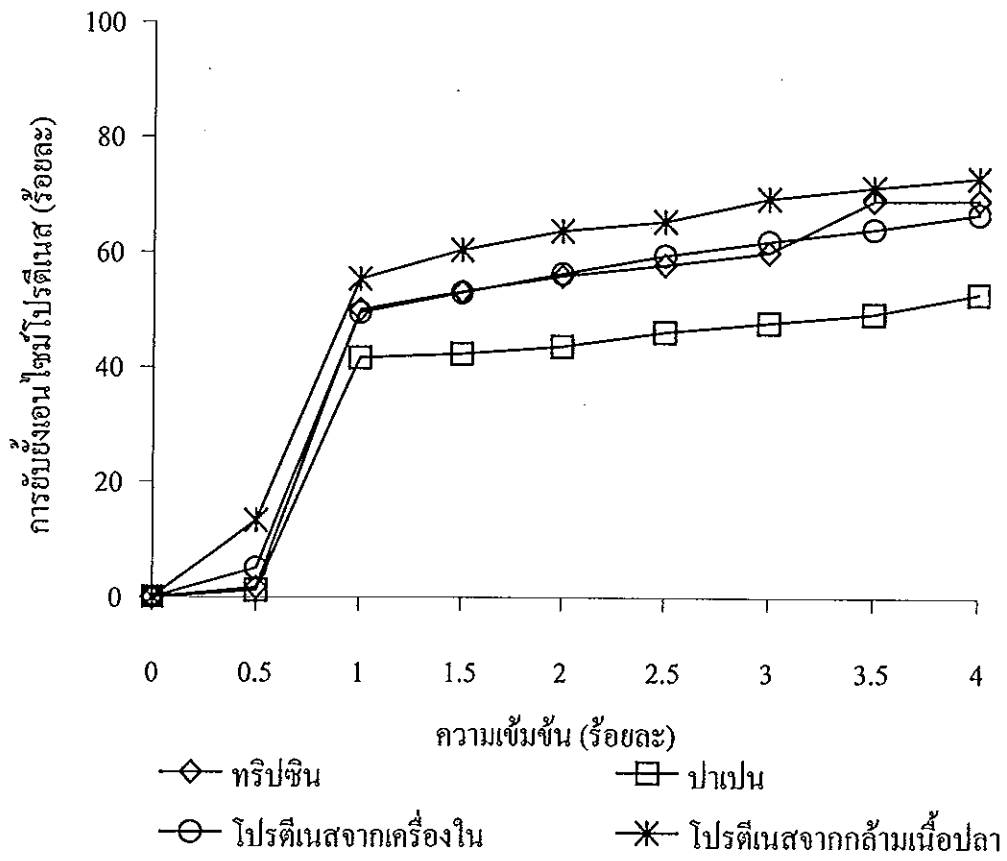
* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

2. การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสของพลาสมาเลือดหมู

2.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสของพลาสมาเลือดหมู

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ปาเปน เอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อและเครื่องในปลาตาหวาน ของพลาสมาเลือดหมูที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 และ 4 (รูปที่ 12) พบว่า การใช้พลาสมาเลือดหมูที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ปาเปน เอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อและเครื่องในปลาตาหวานสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และให้ผลใกล้เคียงกับที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โดยสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ปาเปน เอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อ และเครื่องในปลาตาหวาน ได้ร้อยละ 52.68 40.61 56.29 และ 60.66 ตามลำดับ สำหรับที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสมาเลือดหมูสูงกว่าร้อยละ 1 พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

จากการศึกษา พบว่า พลาสมาเลือดหมูสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ปาเปน เอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อ และเครื่องในปลาตาหวาน ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์จากกล้ามเนื้อปลาตาหวานได้สูงกว่า เอนไซม์จากเครื่องในปลา เอนไซม์ทริปซิน และ เอนไซม์ปาเปน ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถบ่งชี้ได้ว่า กล้ามเนื้อปลาตาหวานประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสจำพวกซีรีนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับเอนไซม์ทริปซิน ดังนั้นจึงถูกยับยั้งได้ใกล้เคียงกับเอนไซม์ทริปซิน Morrissey และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาการใช้พลาสมาเลือดคววในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสในซูริมิจากปลา Pacific whiting พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสได้ถึงร้อยละ 90 และเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 จะให้ผลการยับยั้งสูงขึ้นแต่ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$)



รูปที่ 12 ประสิทธิภาพการยับยั้งไอออนไนต์ทริปพิซิน ปาเปน โปรตีนจากกล้ามเนื้อและเครื่องในปลาตาหวาน ของพลาสมาเลือดหมูที่ความเข้มข้นต่างๆ

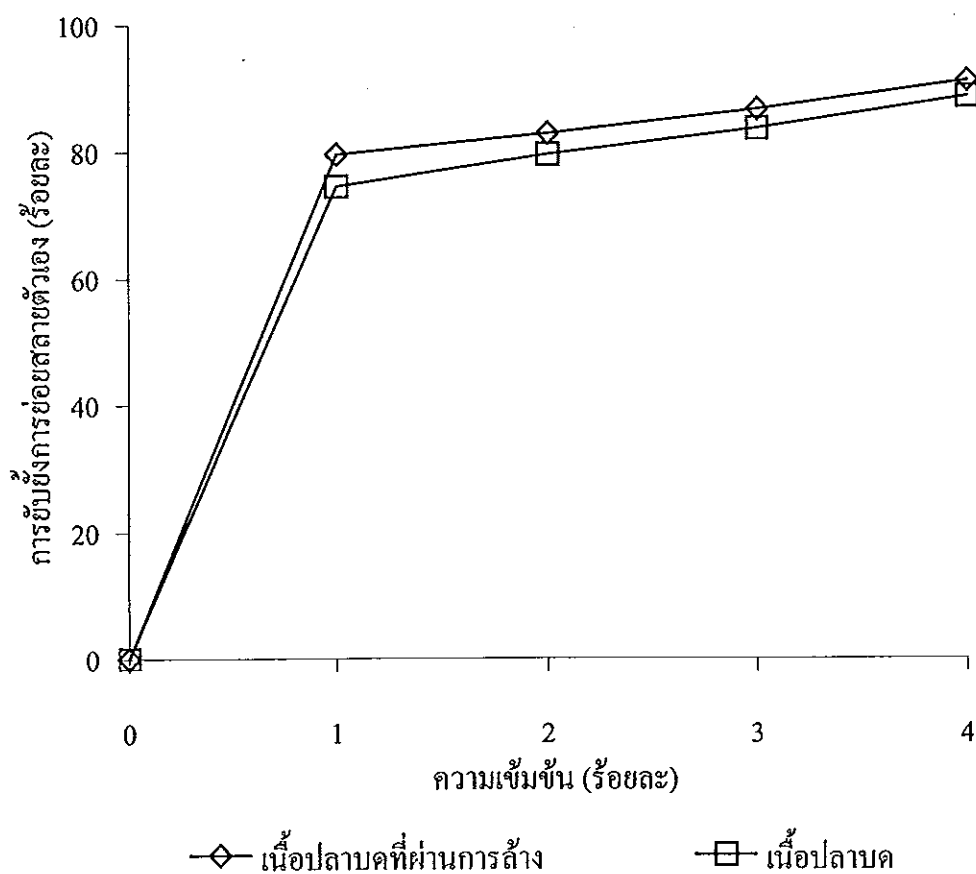
2.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง

จากการศึกษาผลของพลาสติกคลุมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 0 1 2 และ 3) ต่อประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาตาหวานบดที่ผ่านการล้างน้ำ และไม่ผ่านการล้างน้ำ (รูปที่ 13) พบว่า การใช้พลาสติกคลุมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 สามารถยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาตาหวานบดที่ผ่านการล้างน้ำ และไม่ผ่านการล้างน้ำได้ร้อยละ 79.54 และ 74.53 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกสูงกว่าร้อยละ 1 พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาตาหวานบดที่ผ่านการล้างน้ำ และไม่ผ่านการล้างน้ำเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยที่ระดับความเข้มข้นของพลาสติกร้อยละ 4 สามารถยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาตาหวานบดที่ผ่านการล้างน้ำ และไม่ผ่านการล้างน้ำได้ร้อยละ 91.09 และ 88.60 ตามลำดับ ดังนั้นพลาสติกคลุมสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสทั้งชนิดที่พบในของเหลวซาร์โคพลาสมิก หรือชนิดที่จับกับโปรตีนไมโอไฟบริลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยโปรตีนซาร์โคพลาสมิกในเนื้อปลาบดสามารถถูกชะล้างออกไปและอาจเหลืออยู่บางส่วน ดังนั้นเอนไซม์โปรตีนเอสส่วนใหญ่ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายตัวเองในเนื้อปลาบดที่ผ่านการล้าง คือเอนไซม์โปรตีนเอสที่จับกับโปรตีนไมโอไฟบริล อย่างไรก็ตามชนิดและปริมาณของโปรตีนเอสที่เหลือในเนื้อปลาบดที่ผ่านการล้างขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพการล้างและชนิดของโปรตีนเอสในกล้ามเนื้อ ในการแปรรูปซูริมิจากปลา Pacific whiting พบว่า เอนไซม์โปรตีนเอสประมาณร้อยละ 83 ถูกกำจัดในขั้นตอนการล้างและกำจัดน้ำ (Morrissey *et al.*, 1995) ส่วน Chang-Lee และคณะ (1989) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสลดลงเหลือร้อยละ 56.3 ภายหลังจากล้าง 2 ครั้ง

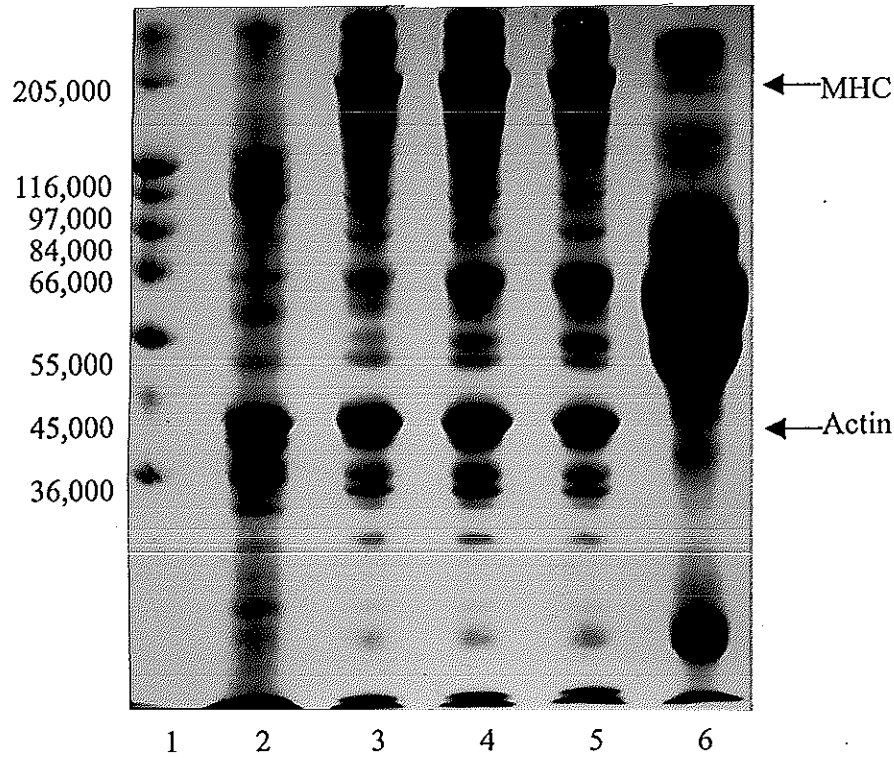
สำหรับการศึกษารูปแบบโปรตีนกล้ามเนื้อปลาที่เติมพลาสติกคลุมร้อยละ 0 0.5 1 และ 2 ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย SDS-PAGE (รูปที่ 14) พบว่า ชุดการทดลองที่เติมพลาสติกคลุมร้อยละ 0.5 (แถวที่ 3) สามารถยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายของแถบไมโอซิน (205 กิโลดาลตัน) ของเนื้อปลาตาหวานบดได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แถวที่ 2) การใช้พลาสติกคลุมร้อยละ 1 และ 2 (แถวที่ 4 และ 5) สามารถรักษาแถบไมโอซินไว้ได้ในปริมาณที่สูงกว่าการใช้พลาสติกคลุมร้อยละ 0.5 สำหรับชุดควบคุมที่ไม่เติมพลาสติก

เลือดหมูไม่พบแถบไมโอซิน แต่จะพบแถบโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 95-120 กิโลดาลตัน เพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของไมโอซินโดยเอนไซม์โปรตีนในกล้ามเนื้อปลาดาทาหวาน อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงของแอกติน (45 กิโลดาลตัน) Benjakul และคณะ (1997) พบว่า การย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลา Pacific whiting ส่วนใหญ่เกิดจากการย่อยสลายของไมโอซินโดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอกติน

จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่า พลาสมาเลือดหมูสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส และยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาดาทาหวานบดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยประสิทธิภาพการยับยั้งขึ้นกับความเข้มข้นของพลาสมาที่ใช้



รูปที่ 13 ประสิทธิภาพของพลาสมาในการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาดาทาหวานบดที่ผ่านการล้างน้ำ และไม่ผ่านการล้างน้ำ



รูปที่ 14 รูปแบบการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลาดุกหวานที่เติมพลาสมาเลือดหมูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย SDS-PAGE (12% running gel และ 4% stacking gel) โดยใช้ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 เนื้อปลาดุกหวานบดที่ไม่เติมพลาสมาเลือดหมู

แถวที่ 3 เนื้อปลาดุกหวานบดที่เติมพลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5

แถวที่ 4 เนื้อปลาดุกหวานบดที่เติมพลาสมาเลือดหมูร้อยละ 1

แถวที่ 5 เนื้อปลาดุกหวานบดที่เติมพลาสมาเลือดหมูร้อยละ 2

แถวที่ 6 พลาสมาเลือดหมู

3. การศึกษาการแยกส่วนองค์ประกอบของพลาสมาเลือดหนู และการตรวจสอบคุณสมบัติของแฟรกชัน

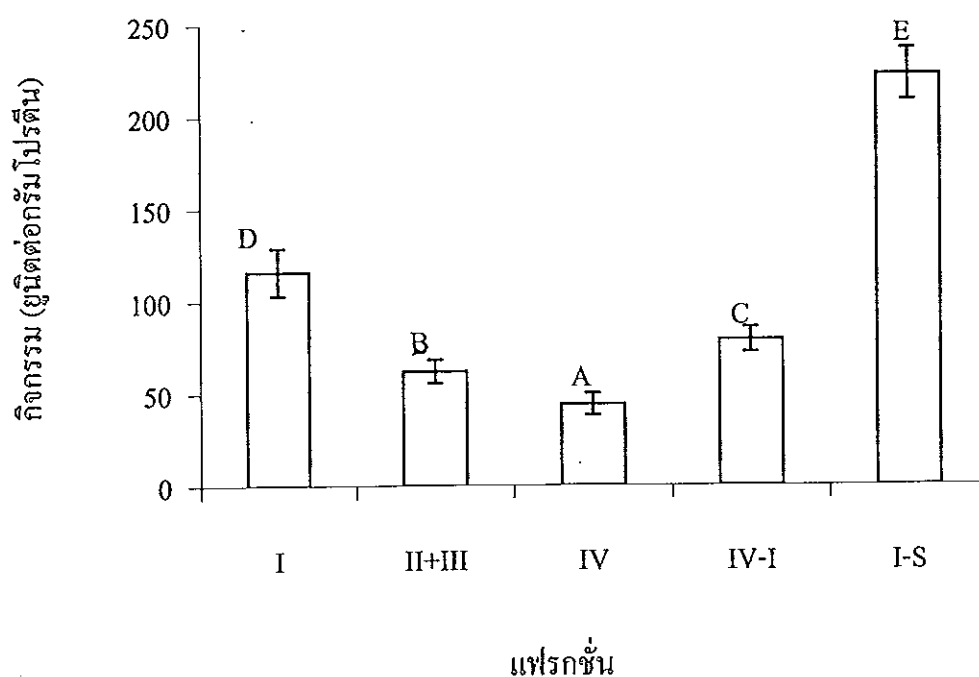
การแยกส่วนองค์ประกอบของพลาสมาเลือดหนู สามารถได้แฟรกชัน 5 แฟรกชัน ได้แก่ แฟรกชัน I ร้อยละ 2.19 ของพลาสมาเลือดหนู แฟรกชัน II+III ร้อยละ 1.34 ของพลาสมาเลือดหนู แฟรกชัน IV ร้อยละ 5 ของพลาสมาเลือดหนู แฟรกชัน IV-I ร้อยละ 4.12 ของพลาสมาเลือดหนู และแฟรกชัน I-S มีปริมาณร้อยละ 72.3 ของแฟรกชัน I (โดยน้ำหนักแห้ง) เมื่อนำแฟรกชันต่างๆ มาทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส และกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนได้ผลการทดลองดังนี้

3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชันต่างๆ

จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแต่ละแฟรกชันโดยวิธี MDC-incorporating activity assay พบว่า แฟรกชัน I-S มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสสูงกว่าแฟรกชันอื่นๆ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสเท่ากับ 223.39 ± 14.05 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน (รูปที่ 15) รองลงมาคือ แฟรกชัน I และ IV-I โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสเท่ากับ 116.44 ± 12.78 และ 79.52 ± 5.20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ตามลำดับ Loewry และคณะ (1961) พบว่า Factor XIII จะรวมตัวอยู่กับไฟบริโนเจน การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที สามารถแยกไฟบริโนเจนออกจาก Factor XIII ได้ ซึ่งจากการทดลอง พบว่า เมื่อนำ แฟรกชัน I มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ได้เป็นแฟรกชัน I-S ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสสูงขึ้น

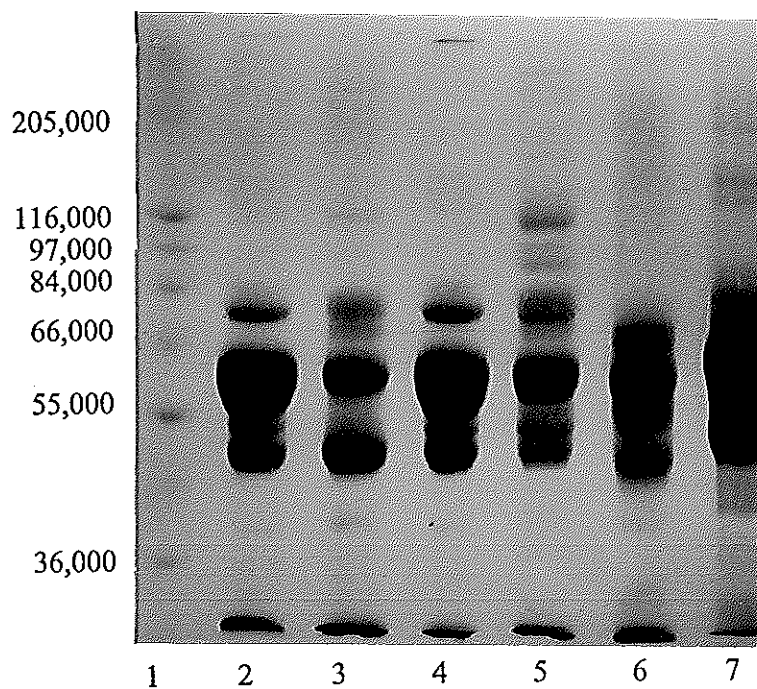
เมื่อนำแฟรกชันต่างๆ มาตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนโดย SDS-PAGE (รูปที่ 16) พบว่า แต่ละแฟรกชันมีแถบโปรตีนที่แตกต่างกันในช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 45 กิโลดาลตัน ถึง 80 กิโลดาลตัน และพบว่า แฟรกชัน IV-I (แถว 5) มีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 84 ถึง 116 กิโลดาลตัน เด่นชัดกว่าแฟรกชันอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนระหว่าง แฟรกชัน I (แถว 2) และ แฟรกชัน I-S (แถว 6) พบว่า แฟรกชัน I-S มีแถบโปรตีน (60 กิโลดาลตัน) ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากในกระบวนการให้ความร้อน 56 องศาเซลเซียส ทำให้โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของพลาสมาโดยเฉพาะไฟบริโนเจนบางส่วนถูกแยกออกไปจากแฟรกชัน I Seymour และคณะ (1997) รายงานถึง องค์ประกอบของ

พลาสมาเลือดวัว ประกอบด้วย โบวินซีรัมอัลบูมิน ร้อยละ 50-55 โกลบูลิน ร้อยละ 45-50 และไฟบริโนเจน ร้อยละ 4 สำหรับองค์ประกอบของแฟรกชัน IV-I ประกอบด้วย โบวินซีรัมอัลบูมิน ร้อยละ 15 α_2 -แมคโครโกลบูลิน ร้อยละ 15 α -โกลบูลิน ร้อยละ 44 β -โกลบูลิน ร้อยละ 24 นอกจากนี้ในพลาสมายังมีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนชนิดอื่นๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำ เช่น คินิโนเจน (Kininogen) (Adan *et al.*, 1985; Muller-Ester *et al.*, 1984) โดย คินิโนเจน มีคุณสมบัติการละลายเหมือนกับ α -โกลบูลิน ซึ่งอาจจะอยู่ในแฟรกชัน IV-I



รูปที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชันต่างๆ

* อักษร A B C D และ E ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$)



รูปที่ 16 รูปแบบโปรตีนของแฟรกชันต่างๆ และพลาสมาเลือดหนู โดย SDS-PAGE (10% running gel และ 4% stacking gel) โดยใช้ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม

แถว 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถว 2 แฟรกชัน I

แถว 3 แฟรกชัน II+III

แถว 4 แฟรกชัน IV

แถว 5 แฟรกชัน IV-I

แถว 6 แฟรกชัน I-S

แถว 7 พลาสมาเลือดหนู

3.2 ผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

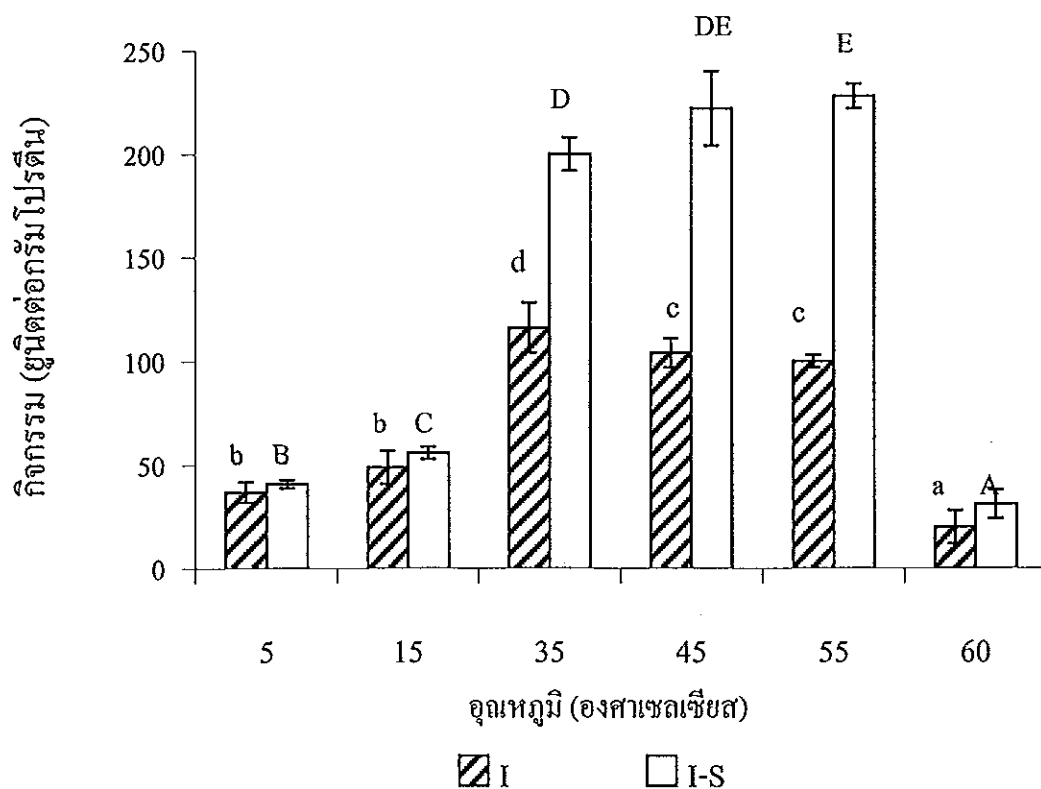
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแต่ละแฟรกชัน พบว่าแฟรกชัน I-S มีกิจกรรมสูงสุด ส่วนแฟรกชัน I ให้กิจกรรมรองลงมา ดังนั้นจึงเลือกแฟรกชันทั้งสอง เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสดังนี้

3.2.1 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสอยู่ในช่วง 35 องศาเซลเซียส ถึง 55 องศาเซลเซียส (รูปที่ 17) โดยแฟรกชัน I-S มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (228.17 ± 6.05 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน) และจะสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับแฟรกชัน I มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (116.39 ± 3.78 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมจะลดลงเล็กน้อย ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับแฟรกชัน I-S

Jaing และ Lee (1992) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ Factor XIII อยู่ในช่วง 25 ถึง 55 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมสูงกว่าร้อยละ 70 (เทียบกับที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส) และจะสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

จากการทดลองถึงแม้ว่าเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I-S กิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งในการทดลองการประยุกต์ให้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสเลือกใช้อุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ส่วนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสในเนื้อปลา ซึ่งอาจก่อให้เกิดโมโดริ นอกจากนี้ในการทดลองผลของการใช้พลาสติกคลุมในซูริมิ (รูปที่ 9) พบว่า การแช่ตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้เจลที่มีคุณภาพสูงสุด ($P < 0.05$)



รูปที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแพรกชัน I และ แพรกชัน I-S

* อักษร a b c d A B C D และ E ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

3.2.2 ผลของแคลเซียมอออน

จากการศึกษาผลของแคลเซียมอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I และแฟรกชัน I-S โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 50 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ พบว่า แฟรกชัน I และแฟรกชัน I-S มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสเพิ่มขึ้น ($P > 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 10) โดยที่ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์มิเนสในแฟรกชัน I และแฟรกชัน I-S ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) Kuraishi และคณะ (1996) กล่าวว่า เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และปลาต้องการแคลเซียมอออนในการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ Lorand (1986) รายงานว่า แคลเซียมอออนมีความจำเป็นต่อการเปลี่ยน Factor XIII zymogen ไปเป็น Factor XIII และมีผลในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์เพื่อให้หมู่เร่งปฏิกิริยาสามารถทำงานปฏิกิริยาได้ดี Jiang และ Lee (1992) พบว่า แคลเซียมอออนมีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของ Factor XIII จากพลาสมาเลือดหมู ดังนั้นแคลเซียมอออนจึงมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในพลาสมาเลือดหมู โดยแคลเซียมอออนจะเร่งการแยกตัวของ b-chain ออกจาก a-chain (รูปที่ 5) ซึ่งเป็นการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (Greenberg *et al.*, 1991; Lorand, 1986)

ตารางที่ 10 ผลของแคลเซียมออกไซด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I และแฟรกชัน I-S

แคลเซียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (ยูนิตต่อกรัม โปรตีน)	
	แฟรกชัน I	แฟรกชัน I-S
0	14.66±1.92 ^a	29.67±4.00 ^a
50	81.20±12.25 ^b	167.67±14.29 ^b
100	100.90±8.97 ^{bc}	197.00±19.36 ^c
150	113.67±15.01 ^c	217.34±11.17 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b และ c ที่เหมือนกันในสคริปต์เดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมี
สำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

3.2.3 ผลของสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ ร้อยละ 1 EDTA ร้อยละ 0.1 และ NEM ร้อยละ 0.1 ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I และ I-S พบว่า สารประกอบมีผลในการยับยั้ง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง) ($P < 0.05$) (ตารางที่ 11) โดย NEM มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I และแฟรกชัน I-S สูงสุด ($P < 0.05$) Nowsad และคณะ (1993) รายงานว่า NEM มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส โดย NEM สามารถบล็อกหมู่ซัลไฮดริลในบริเวณเร่งของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส Brenner และ Wold (1978) พบว่า เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์โดยสารเคมีที่สามารถบล็อกหมู่ซัลไฮดริล แอมโมเนียมคลอไรด์สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสได้ดีกว่า EDTA และ NEM ($P < 0.05$) โดยแอมโมเนียมคลอไรด์สามารถแตกตัวให้ NH_4^+ ที่มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (Wan *et al.*, 1992) Kumazawa และคณะ (1995) พบว่า

การเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 0.66 สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในซูริมิได้ โดยทำให้ความแข็งแรงของเจลซูริมิตลดลงร้อยละ 50 สำหรับ EDTA สามารถจับกับแคลเซียมไอออน ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสลดลง โดย Kumazawa และคณะ (1995) พบว่า EDTA ปริมาณ 5 มิลลิโมลาร์ เพียงพอสำหรับการกำจัดแคลเซียมไอออนในซูริมิทำให้ไม่มีแคลเซียมไอออนเหลือในปริมาณเพียงพอสำหรับการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า แพรกชั้น I และแพรกชั้น I-S ประกอบด้วยเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส ซึ่งมีบทบาทต่อการเร่งการเชื่อมประสานของโปรตีนไมโอไฟบริลในซูริมิระหว่างการแช่ตัว

ตารางที่ 11 ผลของสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแพรกชั้น I และแพรกชั้น I-S

สารยับยั้ง	กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (ยูนิตต่อกรัม โปรตีน)	
	แพรกชั้น I	แพรกชั้น I-S
ชุดควบคุม(ไม่เติม)	98.67±7.02 ^d	228.34±13.20 ^d
NH ₄ Cl ร้อยละ 1	47.66±6.11 ^c	88.67±9.71 ^c
EDTA ร้อยละ 1	31.33±4.04 ^b	52.00±11.53 ^b
NEM ร้อยละ 0.1	14.33±5.56 ^a	30.67±5.68 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b และ c ที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

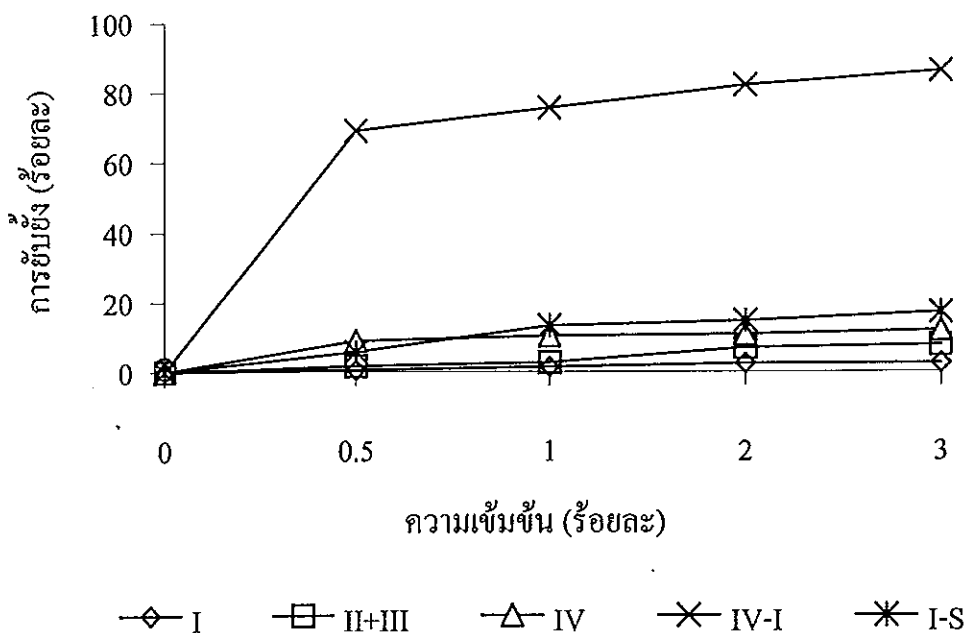
** ตรวจสอบกิจกรรมในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์

3.3 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสของแต่ละแฟรกชัน

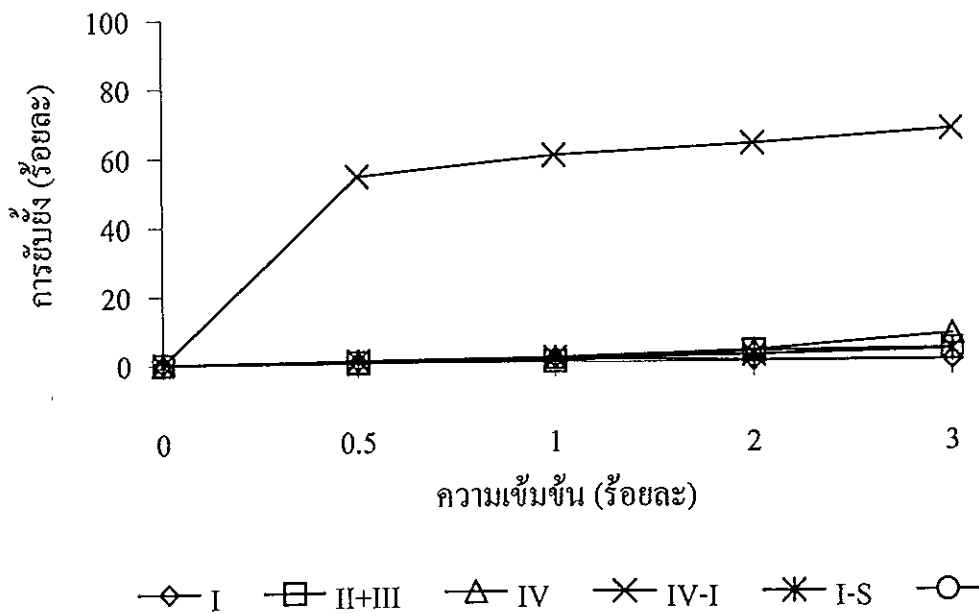
จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน ปาเปน เอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อและเครื่องในปลาหวาน ของแต่ละแฟรกชันที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 2 และ 3 พบว่า แฟรกชัน IV-I มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินสูงสุด (รูปที่ 18) โดยที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินเท่ากับ 68.97 และเมื่อความเข้มข้นของแฟรกชัน IV-I เพิ่มขึ้นประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย สำหรับประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของปาเปนของแฟรกชันต่างๆ แสดงในรูปที่ 19 พบว่า แฟรกชัน IV-I มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ปาเปนสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ปาเปนได้ร้อยละ 54.27 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นของแฟรกชันสูงขึ้น ส่วนรูปที่ 20 และ รูปที่ 21 แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อ และเครื่องในปลาหวาน พบว่า แฟรกชัน IV-I มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อ และเครื่องในปลาหวานสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับแฟรกชันอื่นๆ โดยที่ระดับความเข้มข้นของแฟรกชัน IV-I ร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสได้ร้อยละ 79.0 และ 75.85 ตามลำดับ และเมื่อความเข้มข้นของแฟรกชัน IV-I เพิ่มขึ้นมีผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่า แฟรกชัน IV-I มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ปาเปน เอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อปลาและเครื่องในปลาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับ Gahne และ Juneja (1985) รายงานว่า พลาสมาจากเลือดหมูมีองค์ประกอบของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดซีรีน และ ซีสโตอินในปริมาณสูง นอกจากนี้ Strakey และ Barrett (1977) พบว่า α_2 -แมคโครโกลบูลิน เป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งพบในพลาสมาของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสได้ทุกชนิด

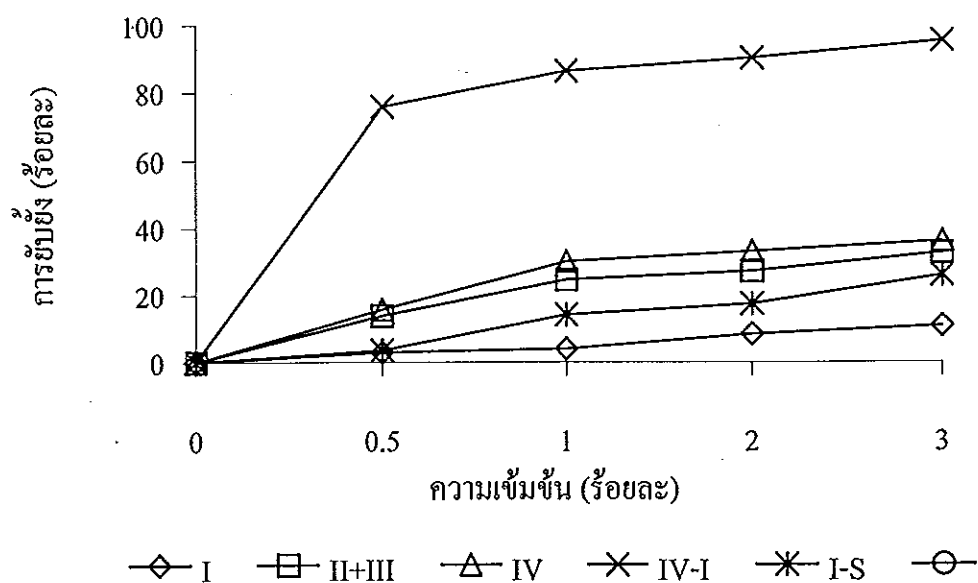
ดังนั้นองค์ประกอบของพลาสมาโดยเฉพาะในแฟรกชัน IV-I สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อปลาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถป้องกันการย่อยสลายตัวเองซึ่งเป็นสาเหตุของการอ่อนตัวของเจลซูริมิ



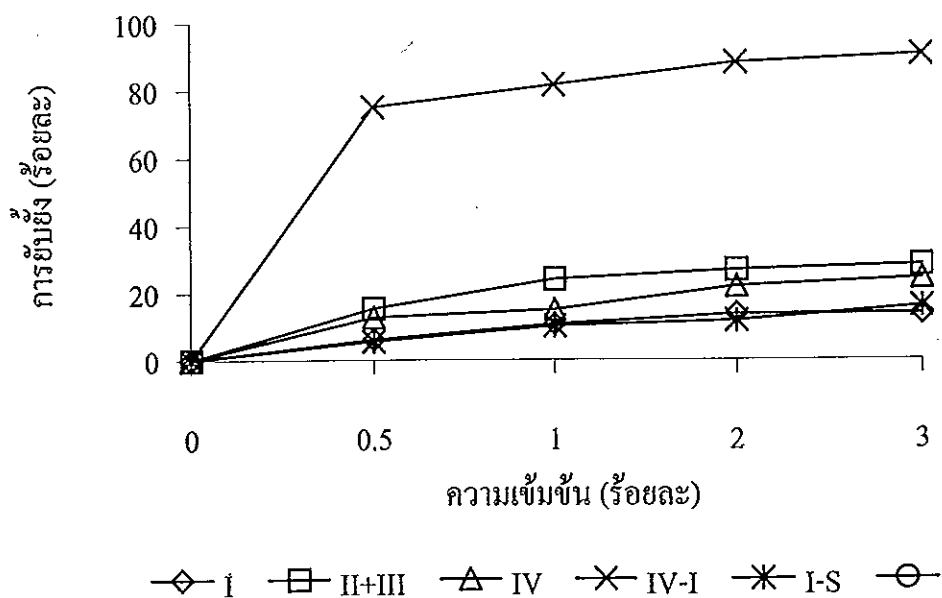
รูปที่ 18 กิจกรรมการงอกของไร่อ้อยของแฟรกชัน I II+III IV IV-I และ I-S



รูปที่ 19 กิจกรรมการงอกของไร่อ้อยของแฟรกชัน I II+III IV IV-I และ I-S



รูปที่ 20 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจากกล้ามเนื้อปลาดาทาหวาน ของเฟรกชัน I II+III IV IV-I และ I-S



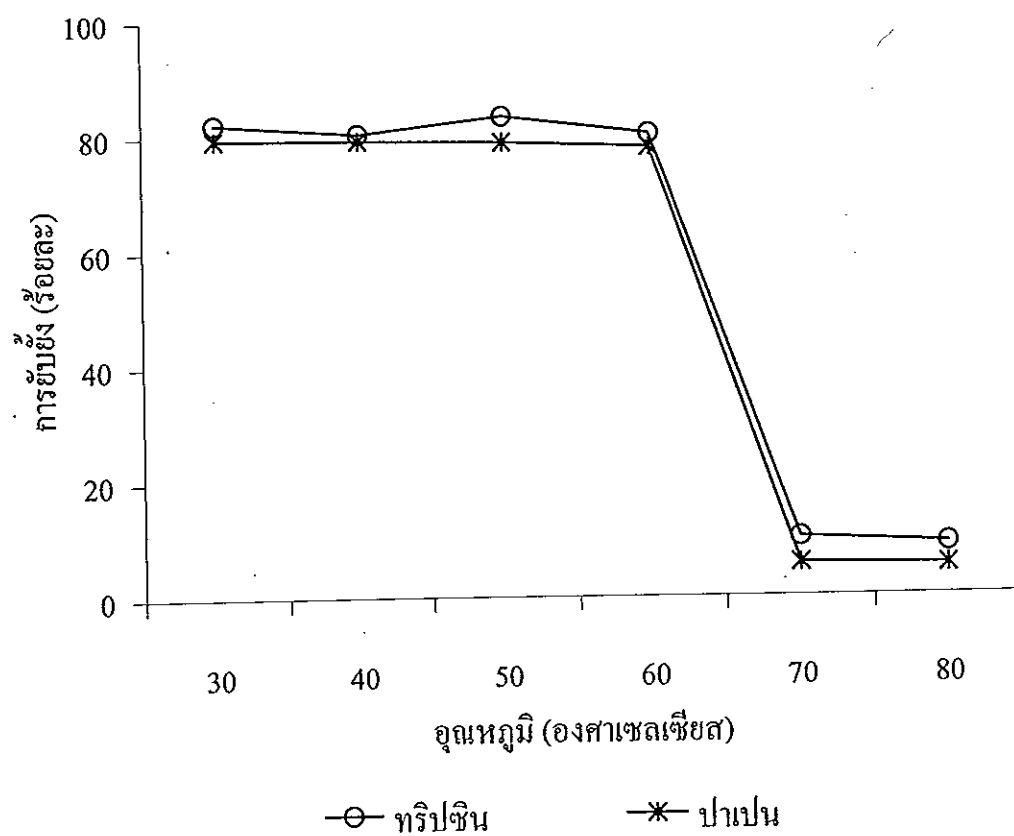
รูปที่ 21 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจากเครื่องในปลาดาทาหวานของเฟรกชัน I II+III IV IV-I และ I-S

3.3.1 ความคงตัวต่อความร้อนของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส

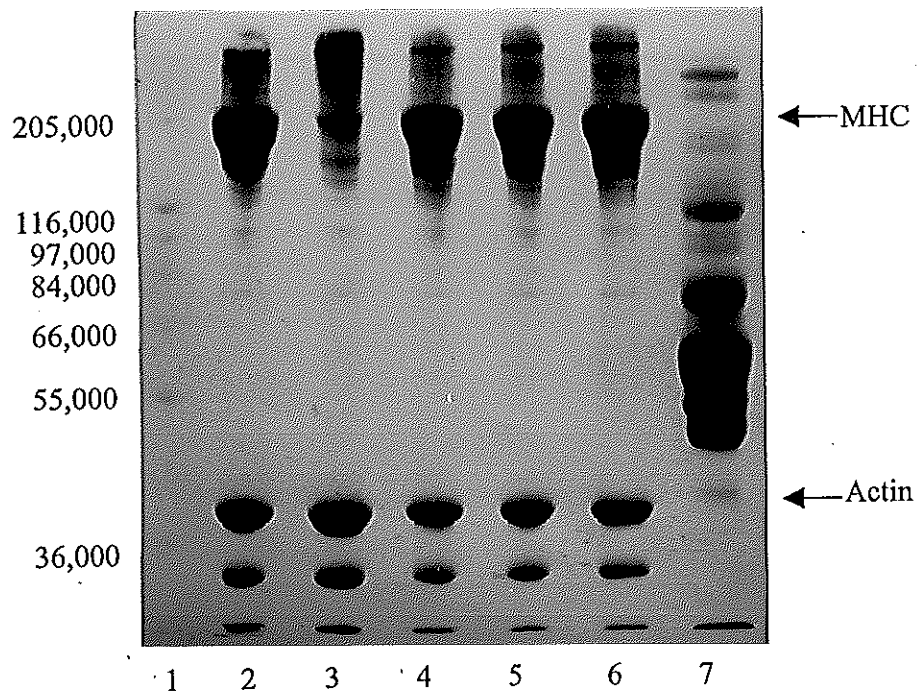
จากการศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสจากแฟรกชัน IV-I ที่อุณหภูมิ 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่า สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสจากแฟรกชัน IV-I มีความคงตัวลดลงอย่างเด่นชัด เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 22) ทั้งนี้เนื่องจากสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสเป็นสารประกอบจำพวกโปรตีนและสามารถสูญเสียสภาพได้โดยความร้อน โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง ความคงตัวของสารยับยั้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีความสำคัญเนื่องจากสารดังกล่าวสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงที่เอนไซม์โปรตีนเอสในชูริมิสามารถมีกิจกรรม โดยเฉพาะเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสที่มีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนตัวของเจลชูริมิในช่วงอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส (Boye and Lanier, 1988) ส่วนเอนไซม์คาบเรปซิน B H และ L ซึ่งพบในปลา Pacific whiting (Seymour *et al.*, 1994) และ arrowtooth flounder (Wasson *et al.*, 1992) สามารถไฮโดรไลซ์โปรตีนในช่วงอุณหภูมิสูง (50-60 องศาเซลเซียส) อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ทั้งเอนไซม์โปรตีนเอสและสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสจะสูญเสียกิจกรรมเนื่องจากความร้อน

3.3.2 ผลต่อการยับยั้งการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาตาหวาน

จากการตรวจรูปแบบโปรตีนกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 และ 1.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 23) พบว่า การเติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (แถวที่ 4) สามารถยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาตาหวานบด โดยเห็นแถบของไมโอซิน (205 กิโลดาลตัน) เด่นชัดเท่ากับเนื้อปลาบดที่ไม่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (แถวที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมแฟรกชัน IV-I (แถวที่ 3) พบว่า แถบของไมโอซินในชุดที่ไม่เติมแฟรกชัน IV-I จางลง ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายตัวเองที่เกิดจากเอนไซม์โปรตีนเอสที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อปลา โดยไมโอซินซึ่งเป็นโปรตีนหลักในเนื้อปลาบดที่ถูกย่อยสลายได้ง่าย (Benjakul *et al.*, 1997) ส่วนแอกติน (45 กิโลดาลตัน) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นไมโอซินของกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายในสถานะที่ไม่เติมแฟรกชัน IV-I ส่งผลให้เกิดเจลที่มีความยืดหยุ่นลดลง



รูปที่ 22 ความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนสจากแพร์กชั้น IV-I



รูปที่ 23 รูปแบบการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลาดุกหวานที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย SDS-PAGE (10% running gel และ 4% stacking gel) โดยใช้ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 เนื้อปลาดุกหวานสด

แถวที่ 3 เนื้อปลาดุกหวานบดที่ไม่เติมแฟรกชัน IV-I

แถวที่ 4 เนื้อปลาดุกหวานบดที่เติมแฟรกชัน IV-I ร้อยละ 0.5

แถวที่ 5 เนื้อปลาดุกหวานบดที่เติมแฟรกชัน IV-I ร้อยละ 1

แถวที่ 6 เนื้อปลาดุกหวานบดที่เติมแฟรกชัน IV-I ร้อยละ 1.5

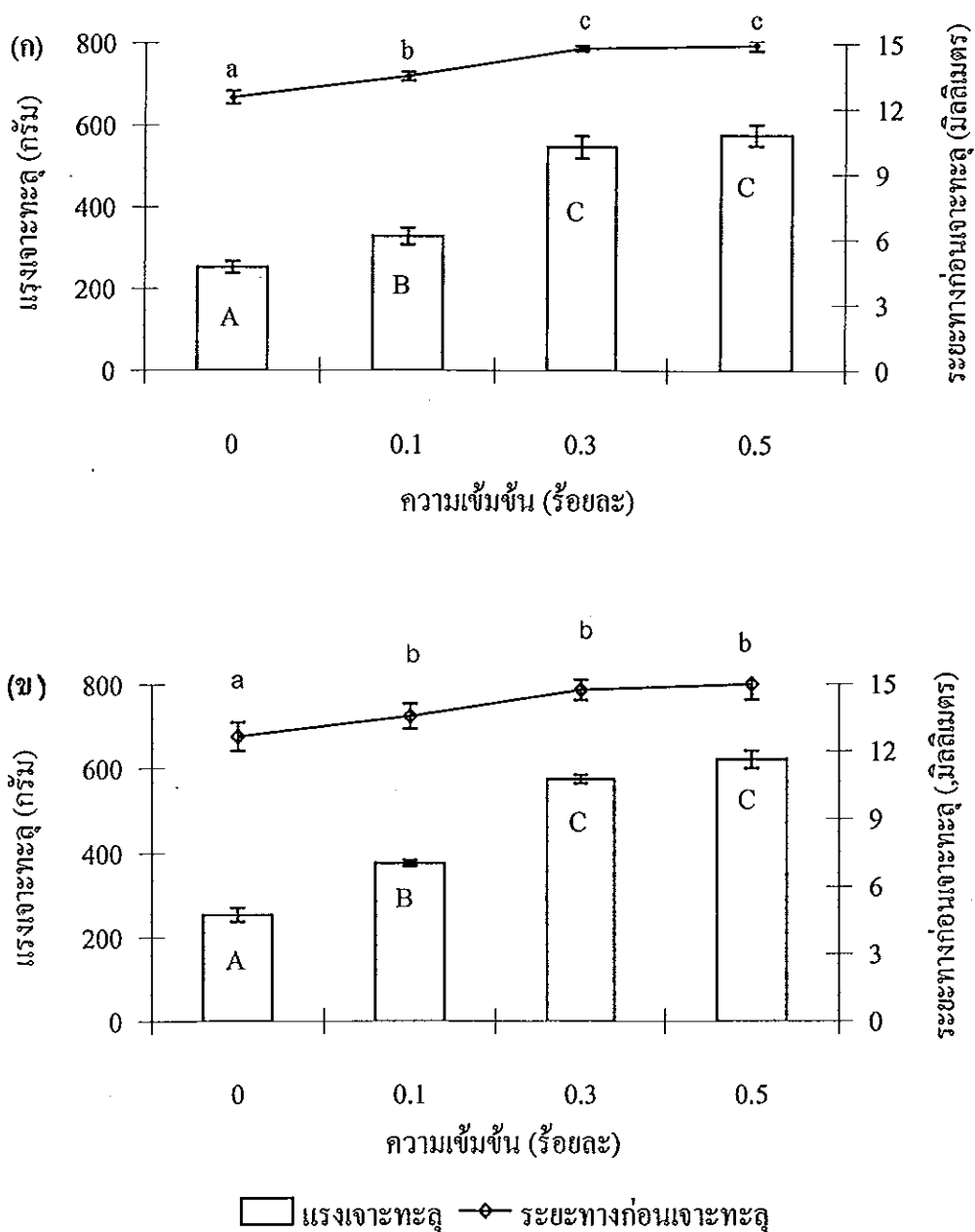
แถวที่ 7 แฟรกชัน IV-I

4 ผลการประยุกต์ใช้แฟรกชันที่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส และกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในเจลดูริมิ

4.1 การประยุกต์ใช้แฟรกชันที่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสในเจลดูริมิ

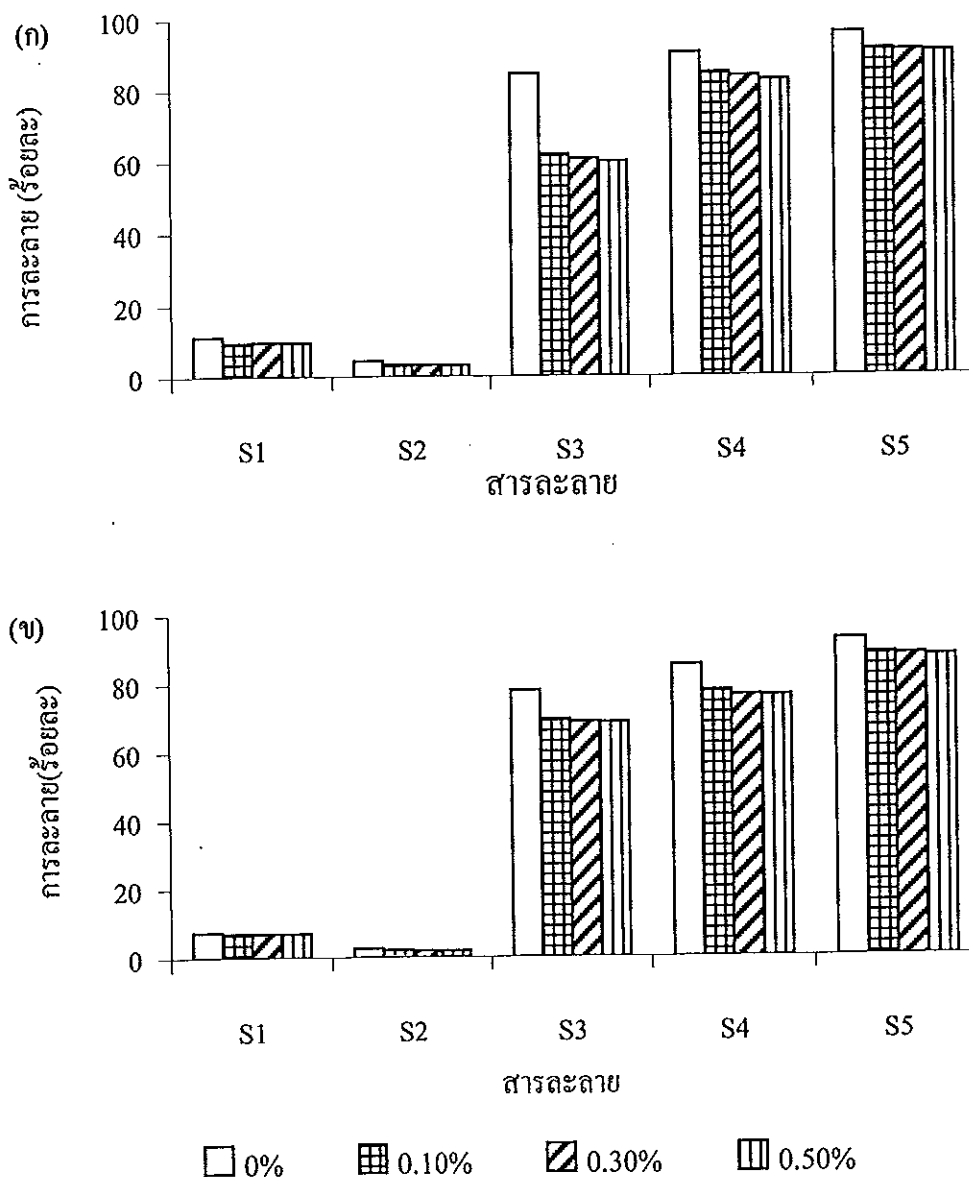
จากการศึกษาผลของการเติมแฟรกชัน IV-I ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.3 และ 0.5 ในเจลดูริมิ และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า ค่าแรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลมอดริที่เติมแฟรกชัน IV-I มีค่าแตกต่างกัน ($P < 0.05$) (รูปที่ 24) โดยค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของแฟรกชัน IV-I เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) เจลมอดริที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.5 มีค่าแรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ทั้งชุดการทดลองที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที Hamann และคณะ (1990) พบว่า โปรตีนจากปลาสามารถป้องกันการเกิดมอดริ และเพิ่มความแข็งแรงของเจลดูริมิปลา menhaden Morrissey และคณะ (1993) รายงานว่า โปรตีนจากปลาสามารถยับยั้งการเกิดเจลมอดริในซูริมิจากปลา Pacific whiting

เมื่อพิจารณาการละลายของเจลมอดริที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.3 และ 0.5 (รูปที่ 25) พบว่า เจลมอดริที่ไม่เติมแฟรกชัน IV-I มีการละลายสูงสุดในสารละลายที่มีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต (S3) ยูเรีย (S4) และเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล (S5) เมื่อเปรียบเทียบกับเจลมอดริที่เติมแฟรกชัน IV-I ทั้งนี้เนื่องจากเจลมอดริที่ไม่มีการเติมแฟรกชัน IV-I ซึ่งมีสมบัติเป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสในกล้ามเนื้อที่มีการย่อยสลายตัวเอง โดยเฉพาะการย่อยสลายไมโอซิน (รูปที่ 23) ดังนั้นจึงก่อให้เกิดเปปไทด์ขนาดเล็กจำนวนมากซึ่งละลายได้ดีกว่าโปรตีนโมเลกุลใหญ่ เมื่อมีการเติมแฟรกชัน IV-I ไมโอซินส่วนใหญ่ยังคงมีปริมาณใกล้เคียงปริมาณเริ่มต้น (รูปที่ 23) ทำให้ความสามารถในการละลายในสารละลายต่ำกว่าเปปไทด์ขนาดเล็ก ส่วนเจลดูริมิที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีการละลายในสารละลายทุกชนิดใกล้เคียงกัน



รูปที่ 24 แรงเฉาะทะลุ และระยะทางก่อนเฉาะทะลุของเจลซูริมิที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ก) เจล โม โดริ (ข) เจล โม โดริที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

* อักษร a b c A B และ C ที่เหมือนกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)



รูปที่ 25 การละลายของเจลาซุรีมิที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ก) เจลาโมโครี (ข) เจลาโมโครีที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

S1 : 0.6 M KCl

S2 : 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8

S3 : S2 + 1% SDS (w/v)

S4 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea

S5 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea + 2% β ME (v/v)

สำหรับความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลโมโคริที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 12) พบว่า ความขาวของเจลโมโคริลดลงเล็กน้อยเมื่อเติมแฟรกชัน IV-I เพิ่มขึ้น แต่เจลโมโคริที่ผ่านการให้ความร้อนมีความขาวไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยเจลโมโคริที่ผ่านการให้ความร้อนมีความขาวมากกว่าเจลโมโคริที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน ส่วนปริมาณของเหลวจากการบีบอัดไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อความเข้มข้นของแฟรกชัน IV-I เพิ่มขึ้น แต่มีค่าสูงกว่าเจลที่ไม่เติมแฟรกชัน IV-I ทั้งนี้อาจเป็นผลจากเจลที่เติมแฟรกชัน IV-I มีโครงข่ายของเจลที่แข็งแรงและสมบูรณ์มากกว่าเจลที่ไม่เติมแฟรกชัน IV-I ซึ่งเป็นผลมาจากแฟรกชัน IV-I สามารถยับยั้งการย่อยสลายไมโอซิน ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเจล ทำให้มีโครงข่ายเจลที่สามารถกักเก็บน้ำได้ดีกว่า

ตารางที่ 12 ความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลโมโคริที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน

เจล	ความเข้มข้นของแฟรกชัน IV-I (ร้อยละ)	ความขาว	ปริมาณของเหลวจากการบีบอัด (ร้อยละ)
เจลโมโคริ	0	70.16±0.91 ^b	2.62±0.05 ^b
	0.1	70.06±0.36 ^b	2.07±0.19 ^a
	0.3	69.88±1.20 ^{ab}	2.13±0.07 ^a
	0.5	69.40±0.67 ^a	2.15±0.12 ^a
เจลโมโคริที่ผ่านการให้ความร้อน (90 องศาเซลเซียส 20 นาที)	0	73.92±0.22 ^{ns}	2.67±0.07 ^b
	0.1	73.56±0.27 ^{ns}	2.09±0.12 ^a
	0.3	73.55±0.35 ^{ns}	2.16±0.07 ^a
	0.5	73.17±0.10 ^{ns}	2.17±0.11 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b และ ns ที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

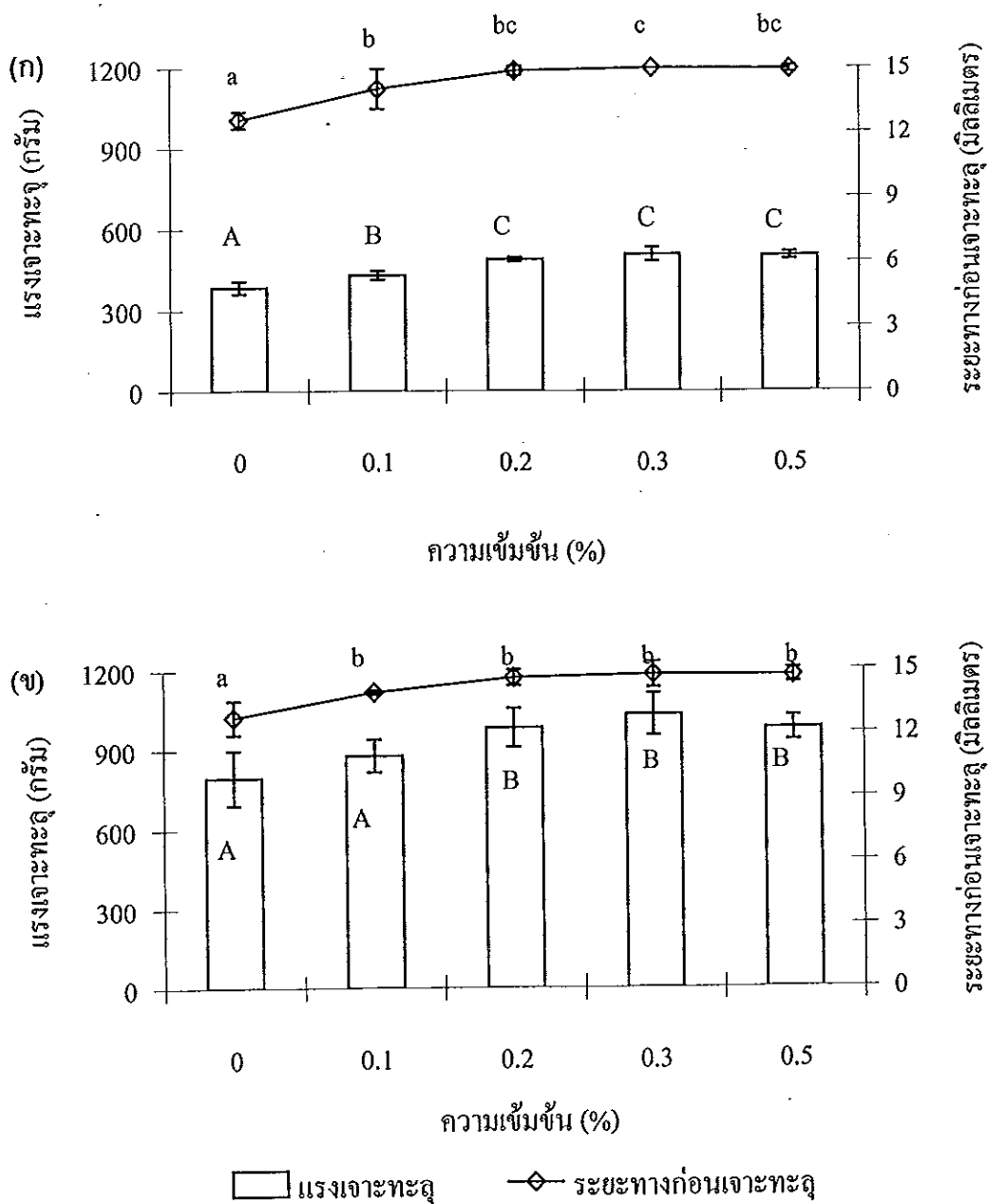
* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

4.2 การประยุกต์ใช้แฟรกชันที่มีเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในเจลซูริมิ

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของแฟรกชัน

จากการศึกษาความแข็งแรงของเจลซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 0.3 และ 0.5 ในสภาวะที่มี แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน โดยเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที พบว่า เจลซูวารีมีค่าแรงเกาะทะเล และระยะทางก่อนเกาะทะเลแตกต่างกัน ($P < 0.05$) (รูปที่ 26ก) เจลซูวารีที่มีการเติมแฟรกชัน I-S มีค่าแรงเกาะทะเลและระยะทางก่อนเกาะทะเลสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแฟรกชัน I-S ($P < 0.05$) โดยเจลซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีค่าแรงเกาะทะเลและระยะทางก่อนการเกาะทะเลเท่ากับ 487.92 กรัม และ 14.87 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.5 ($P > 0.05$)

สำหรับเจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (รูปที่ 26ข) พบว่า เจลซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 มีค่าแรงเกาะทะเล และระยะทางก่อนเกาะทะเลสูงกว่าชุดควบคุม และชุดที่เติมแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.1 ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากเจลซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.3 และ 0.5 ($P > 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Jiang และ Lee (1992) พบว่า การเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากปลาสดที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีผลให้ความแข็งแรงของเจลจากเนื้อปลา mackerel บดเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) Seguro และคณะ (1995) รายงานว่า เมื่อเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.03 โดยน้ำหนักลงในเนื้อปลา Alaska pollock บด ทำให้เจลที่ได้มีคุณภาพเนื้อสัมผัสสูงกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส และชุดที่เติมในปริมาณน้อยกว่า

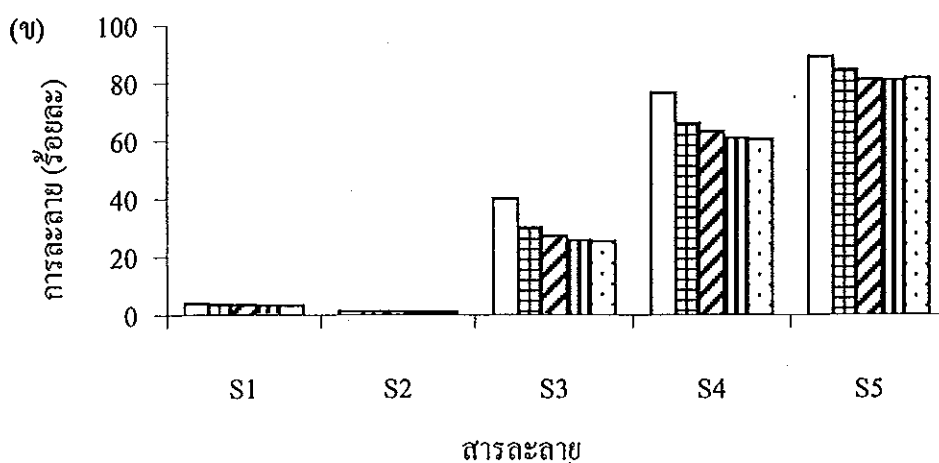
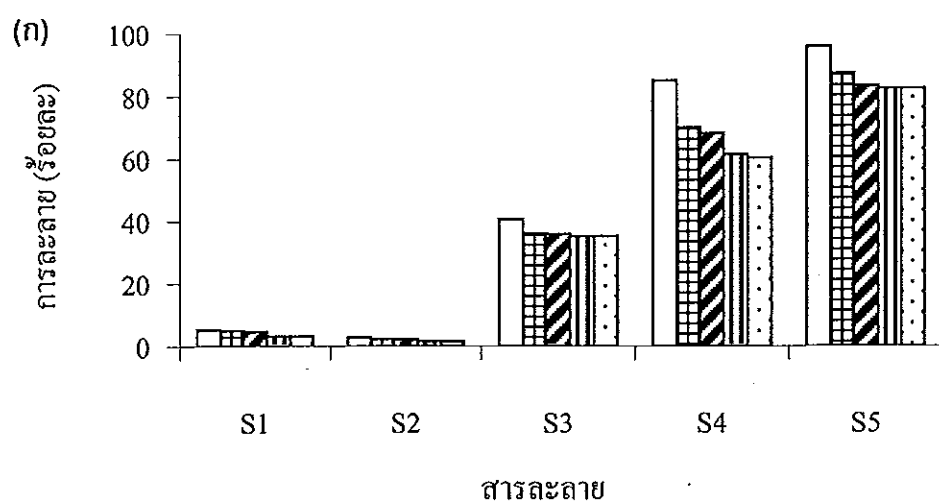


รูปที่ 26 แรงเฉาะทะลุด และระยะทางก่อนเฉาะทะลุดของเกล็ดซูริมิที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มนต่างๆ ในสภาวะที่แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (ก) เกล็ดซูริมิ (ข) เกล็ดซูริมิที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

* อักษร a b c A B และ C ที่เหมือนกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากการตรวจสอบการละลายของเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 0.3 และ 0.5 (รูปที่ 27) พบว่า การละลายของเจลซูวาริที่ไม่เติมแฟรกชัน I-S สูงสุด ทั้งในสารละลายที่มีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต (S3) ยูเรีย (S4) และเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (S5) เมื่อเปรียบเทียบกับเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ส่วนเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีค่าการละลายในสารละลายทุกชนิดลดลง โดยที่ความเข้มข้นของแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 มีค่าการละลายไม่แตกต่างกับความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.5 ($P > 0.05$) เมื่อพิจารณาการละลายในสารละลาย S5 พบว่า การใช้แฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2-0.5 ให้การละลายต่ำกว่าชุดควบคุม และชุดการทดลองที่เติมแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.1 ซึ่งบ่งชี้ถึงการเติมแฟรกชัน I-S มีผลให้พันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะโคเวเลนต์เกิดมากขึ้น เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I-S ที่เติมลงในซูริมิ และเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในกล้ามเนื้อปลา ซึ่งสอดคล้องกับค่าแรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุที่เพิ่มขึ้นเมื่อเติมแฟรกชัน I-S ส่วนเจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อนให้ผลเช่นเดียวกัน

จากการตรวจสอบความขาว และปริมาณของของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 13) พบว่า ความขาวของเจลซูวาริที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) เมื่อเติมแฟรกชัน I-S เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลไม่แตกต่างกันเมื่อความเข้มข้นของแฟรกชัน I-S เพิ่มขึ้น ($P > 0.05$)



□ 0% ▨ 0.10% ▩ 0.20% ▪ 0.30% ▫ 0.50%

รูปที่ 27 การละลายของเจลาซุริมิที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (ก) เจลาซุวารี (ข) เจลาซุวารีที่ผ่านการให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

S1 : 0.6 M KCl

S2 : 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8

S3 : S2 + 1% SDS (w/v)

S4 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea

S5 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea + 2% β ME (v/v)

ตารางที่ 13 ความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิโน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน

เจล	ความเข้มข้นของ แฟรกชัน I-S (ร้อยละ)	ความขาว	ปริมาณของเหลวจากการ บีบอัด(ร้อยละ)
เจลซูวาริ	0	70.15±0.09 ^{ns}	1.92±0.05 ^a
	0.1	71.04±0.80 ^{ns}	2.06±0.09 ^{ab}
	0.2	70.05±0.13 ^{ns}	2.13±0.13 ^b
	0.3	69.91±0.37 ^{ns}	2.15±0.06 ^b
	0.5	69.87±0.91 ^{ns}	2.15±0.09 ^b
เจลซูวาริที่ผ่าน การให้ความร้อน (90 องศาเซลเซียส 20 นาที)	0	79.91±0.61 ^{ns}	2.11±0.11 ^{ns}
	0.1	79.91±0.80 ^{ns}	2.13±0.06 ^{ns}
	0.2	79.29±0.33 ^{ns}	2.17±0.12 ^{ns}
	0.3	79.29±0.11 ^{ns}	2.18±0.10 ^{ns}
	0.5	79.20±0.37 ^{ns}	2.22±0.04 ^{ns}

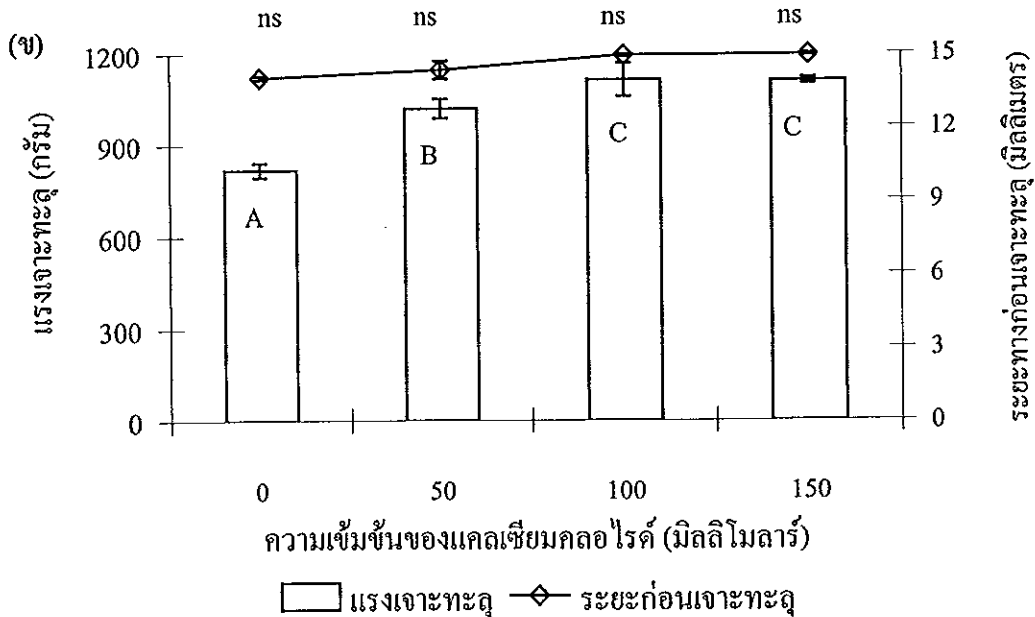
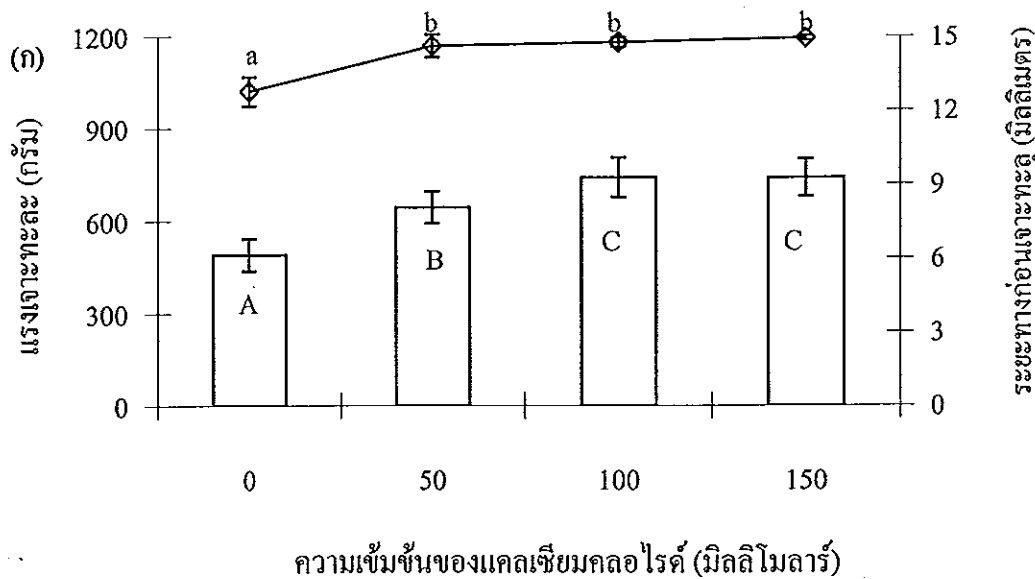
หมายเหตุ ตัวอักษร a b และ ns ที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

4.2.2 ผลของแคลเซียมอ็อกสน

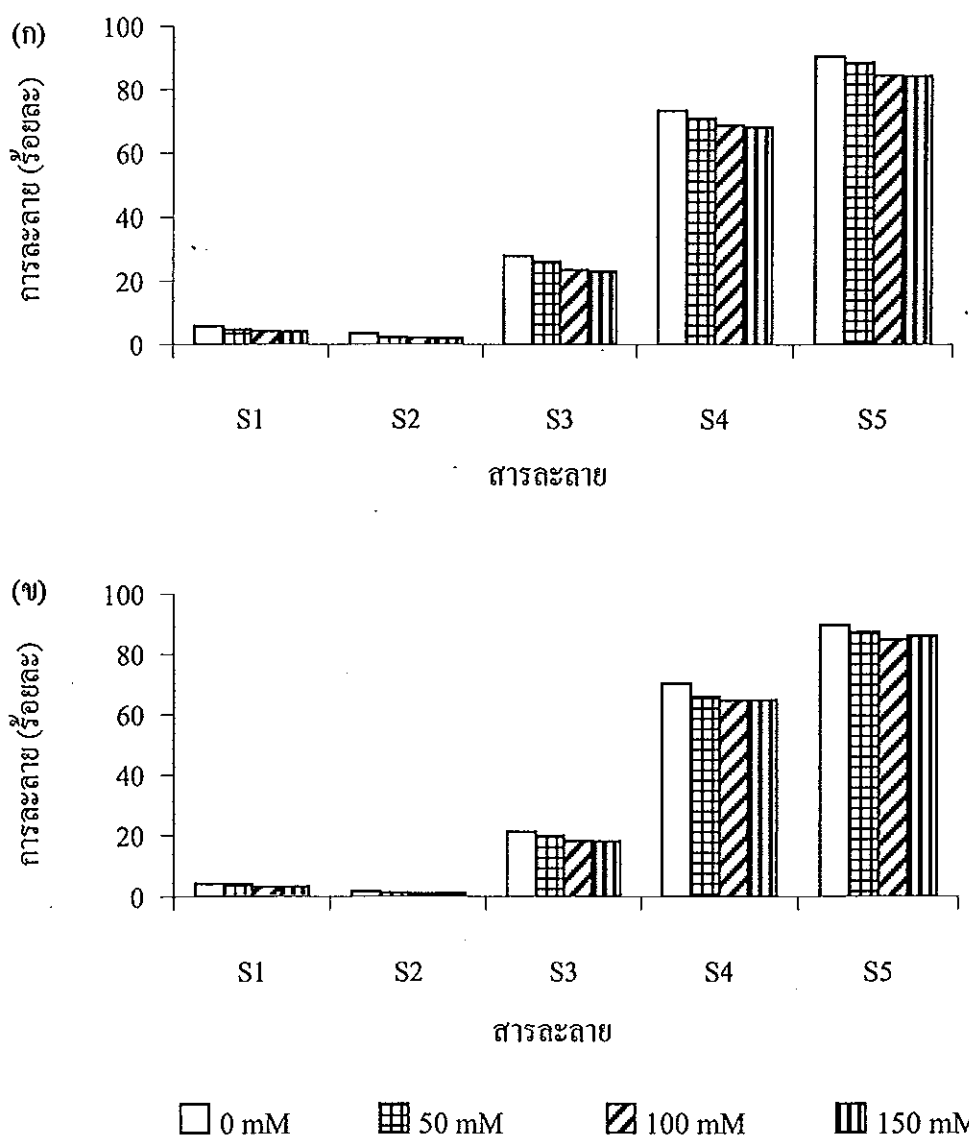
จากการศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 50 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ต่อเจลซูวาริในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 และทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน พบว่า ค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) (รูปที่ 28) เจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ มีค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) เนื่องจากปริมาณแคลเซียมอ็อกสนในซูริมีอามีเพียงเล็กน้อย การเติมแคลเซียมคลอไรด์ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น มีผลให้ค่าแรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุสูงขึ้น Lorand (1986) พบว่า แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากพลาสมาเลือดหมู ดังนั้นที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 150 มิลลิโมลาร์ จึงมากเกินไปต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสทำให้ค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุไม่แตกต่างกับการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ สำหรับเจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อนให้ผลเช่นเดียวกับเจลซูวาริที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน

จากการตรวจสอบการละลายของเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน (รูปที่ 23) พบว่า การละลายในสารละลายที่มีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต (S3) ยูเรีย (S4) และเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล (S5) มีค่าต่ำลง เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น โดยเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ มีการละลายไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนการเจาะทะลุ เมื่อพิจารณาการละลายใน S5 พบว่า การใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าการละลายต่ำสุดแต่ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) บ่งชี้ถึงการมีพันธะโควาเลนต์ชนิดที่ไม่ใช่พันธะโควัลไฟด์สูงสุด โดยเฉพาะพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I-S และเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในกล้ามเนื้อ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อระดับของแคลเซียมอ็อกสนเพิ่มขึ้น



รูปที่ 28 แรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูริมิเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (ก) เจลซูวารี (ข) เจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

* อักษร a b ns A B และ C ที่เหมือนกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)



รูปที่ 29 การละลายของเจลาตินเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรมอบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (ก) เจลาซัวร์ (ข) เจลาซัวร์ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

S1 : 0.6 M KCl

S2 : 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8

S3 : S2 + 1% SDS (w/v)

S4 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea

S5 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea + 2% β ME (v/v)

สำหรับความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 14) พบว่า ความขาวและปริมาณของเหลวจากการบีบอัดไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) สำหรับเจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อนให้ผลเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 14 ความขาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S เข้มข้นร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน

เจล	ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	ความขาว	ปริมาณของเหลวจากการบีบอัด (ร้อยละ)
เจลซูวาริ	0	69.31±0.60 ^{ns}	2.05±0.11 ^{ns}
	50	69.57±0.51 ^{ns}	2.13±0.07 ^{ns}
	100	69.60±0.66 ^{ns}	2.20±0.09 ^{ns}
	150	69.63±0.25 ^{ns}	2.09±0.08 ^{ns}
เจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อน (90 องศาเซลเซียส 20 นาที)	0	79.45±0.57 ^{ns}	2.07±0.13 ^{ns}
	50	79.48±0.13 ^{ns}	2.15±0.08 ^{ns}
	100	79.54±0.28 ^{ns}	2.22±0.03 ^{ns}
	150	79.76±0.25 ^{ns}	2.17±0.06 ^{ns}

หมายเหตุ ตัวอักษร ns ที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

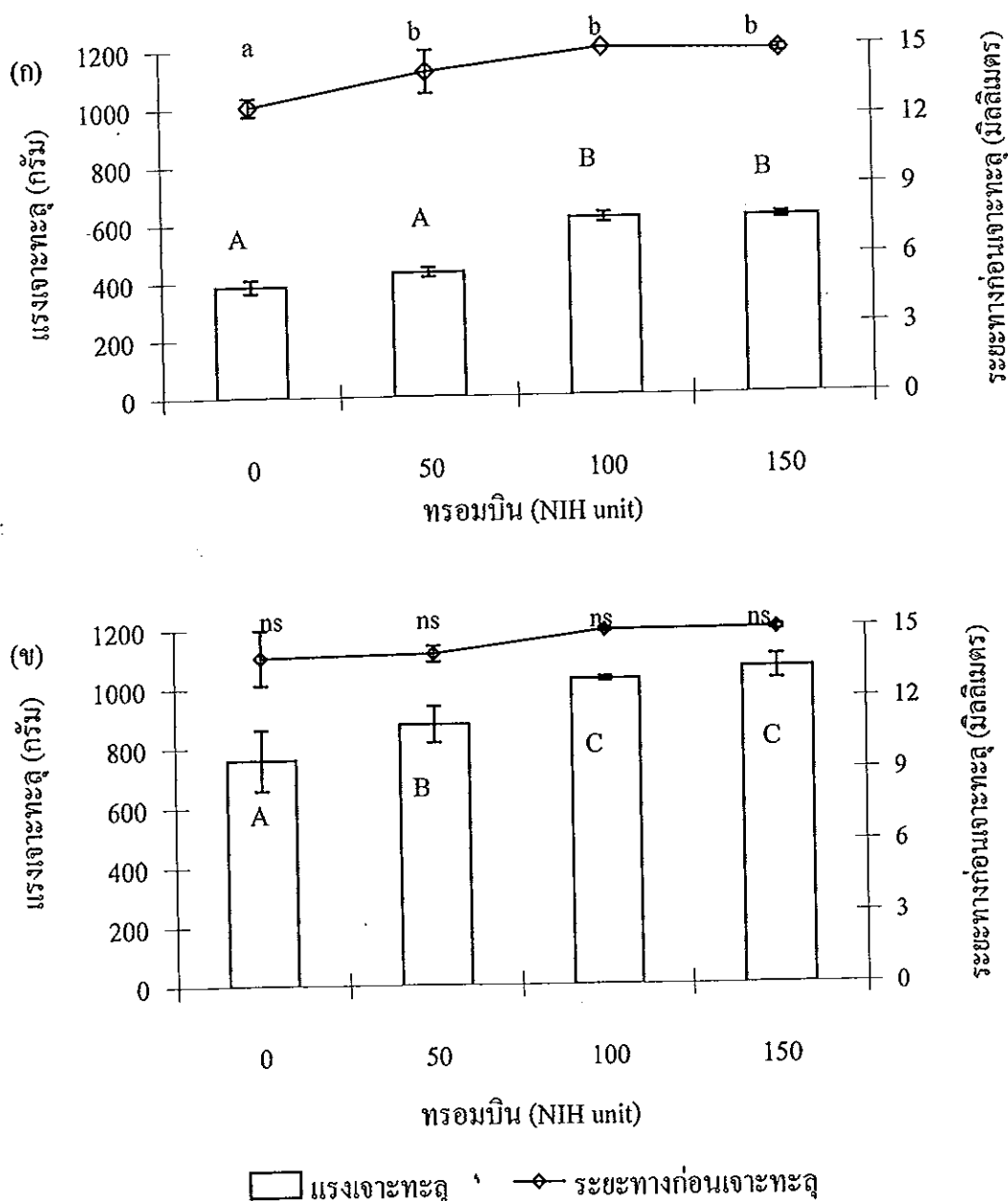
* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

4.2.3 ผลของทรอมบิน

จากการศึกษาผลของทรอมบินที่ระดับความเข้มข้น 50 100 และ 150 NIH ยูนิต์ต่อกรัมแฟรกชัน ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 และแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที พบว่า แรงเฉาะทะเลดู และระยะทางก่อนเฉาะทะเลดูของเจลซูวาริที่เติมทรอมบินสูงขึ้น ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเจลซูวาริที่ไม่เติมทรอมบิน (รูปที่ 30) โดยค่าแรงเฉาะทะเลดู และระยะทางก่อนเฉาะทะเลดูของซูวาริสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของทรอมบินเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) แต่การเติมทรอมบิน 100 และ 150 NIH ยูนิต์ต่อกรัมแฟรกชัน ให้เจลที่มีค่าแรงเฉาะทะเลดู และระยะทางก่อนเฉาะทะเลดูไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากพลาสมาต้องการทรอมบินสำหรับการกระตุ้นการทำงาน (De Backer-Royer *et al.*, 1992) โดยทรอมบินทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน Arg₃₇-Gly₃₈ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ a-chain (Takahashi *et al.*, 1987) ส่วนเจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อนให้ผลเช่นเดียวกัน

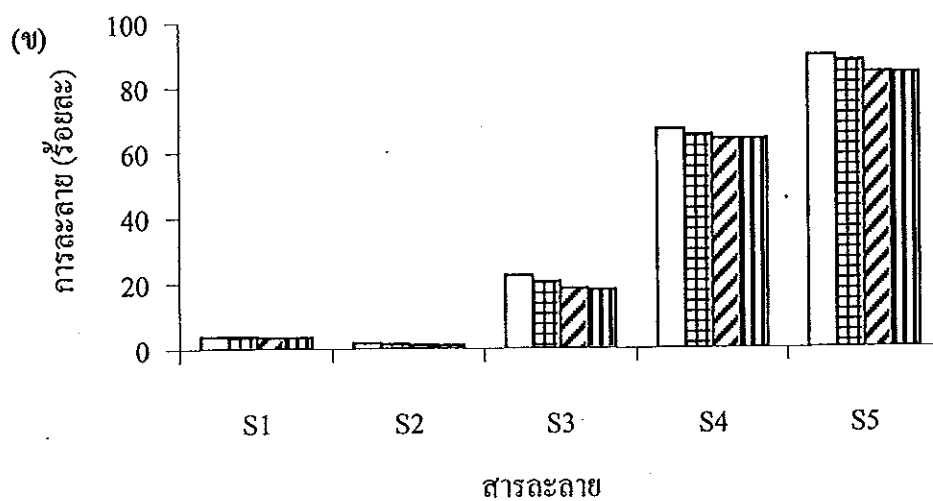
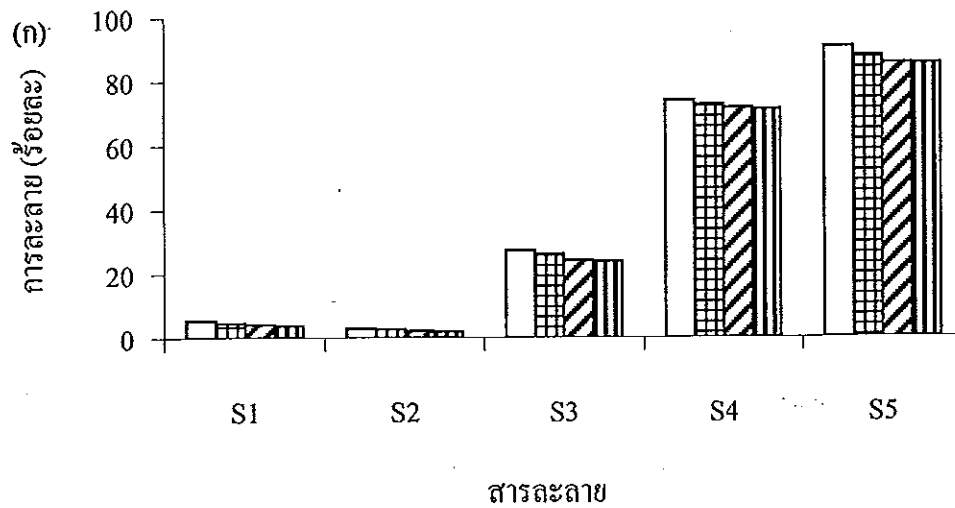
จากการศึกษาการละลายของเจลซูวาริที่เติมทรอมบินระดับความเข้มข้นต่างๆ (รูปที่ 31) พบว่า การละลายในสารละลายที่มีโซเดียมโคเดซิลซัลเฟต (S3) ยูเรีย (S4) และเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล (S5) มีค่าต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของทรอมบินเพิ่มขึ้น โดยการเติมทรอมบินที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 150 NIH ยูนิต์ต่อกรัมแฟรกชัน I-S ให้เจลที่มีการละลายไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับค่าแรงเฉาะทะเลดู และระยะทางก่อนเฉาะทะเลดู เมื่อพิจารณาการละลายของเจลซูวาริที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนในสารละลาย S5 พบว่า การเติมทรอมบิน 100 และ 200 NIH ยูนิต์ต่อกรัมแฟรกชัน มีการละลายต่ำสุด แสดงว่าในสถานะที่มีทรอมบินสูงขึ้นไปมีผลต่อการเร่งการเกิดพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I-S จากพลาสมา

สำหรับความขาวและปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวาริที่เติมทรอมบินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 15) พบว่า ความขาวและปริมาณของเหลวจากการบีบอัดไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) สำหรับเจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อนให้ผลเช่นเดียวกัน



รูปที่ 30 แรงเจลทะเลดู และระยะทางก่อนเจลทะเลดูของเจลซูริมิที่เติมทรอมบินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (ก) เจลซูวาริ (ข) เจลซูวาริที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

* อักษร a b ns AB และ C ที่เหมือนกันภายใต้สภาวะการให้ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)



□ 0 NIH หน่วย ▨ 50 NIH หน่วย ▩ 100 NIH หน่วย ▮ 150 NIH หน่วย

รูปที่ 31 การละลายของเจลซูริมิที่ที่เติมทรอมบินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แกลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (ก) เจลซูวารี (ข) เจลซูวารีที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

S1 : 0.6 M KCl

S2 : 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8

S3 : S2 + 1% SDS (w/v)

S4 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea

S5 : S2 + 1% SDS (w/v) + 8 M urea + 2% β ME (v/v)

ตารางที่ 15 ความยาว และปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูริมิที่เติมทรอมบินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S เข้มข้นร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน

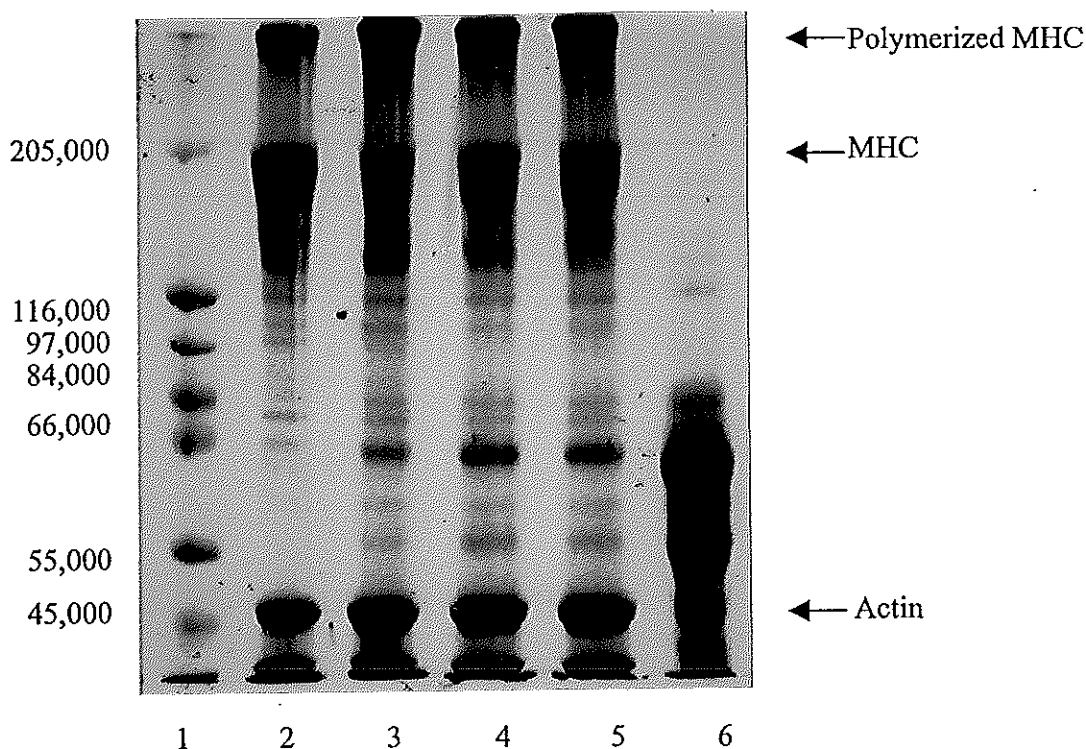
เจล	ทรอมบิน (NIH ยูนิท ต่อกรัมแฟรกชัน)	ความยาว	ปริมาณของเหลวจาก การบีบอัด (ร้อยละ)
เจลซูวารี	0	69.12±0.92 ^{ns}	1.95±0.05 ^a
	50	69.43±0.44 ^{ns}	2.06±0.09 ^{ab}
	100	69.29±0.38 ^{ns}	2.08±0.11 ^{ab}
	200	69.57±0.10 ^{ns}	2.15±0.07 ^b
เจลซูวารีที่ผ่าน การให้ความร้อน (90 องศาเซลเซียส 20 นาที)	0	79.69±0.41 ^{ns}	2.07±0.08 ^{ns}
	50	79.29±0.11 ^{ns}	2.16±0.02 ^{ns}
	100	79.87±0.67 ^{ns}	2.17±0.07 ^{ns}
	200	79.17±0.41 ^{ns}	2.16±0.07 ^{ns}

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b และ ns ที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันภายใต้การให้ความร้อนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

4.2.4 รูปแบบโปรตีนของเจลซูริมิที่เติมแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ทรานส์กลูตามิเนส

จากการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 0.5 และ 1 ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH หน่วยต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (รูปที่ 32) พบว่า การเติมแฟรกชันที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (แถวที่ 3) สามารถลดแถบของไมโอซิน (205 กิโลดาลตัน) โดยมีแถบของพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเจลที่ไม่เติมแฟรกชัน I-S ซึ่งสอดคล้องกับ Nishimoto และคณะ (1987) รายงานว่า ปริมาณไมโอซินที่ลดลงเป็นผลมาจากการเชื่อมประสานของไมโอซินเกิดเป็นโมเลกุลใหญ่ขึ้น Hossain และคณะ (1998) พบว่า การเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่สกัดจากปลาชนิดต่างๆ ในเนื้อปลาทำให้เกิดการเชื่อมประสานของไมโอซินเกิดเป็นโมเลกุลใหญ่ขึ้นทำให้ปริมาณไมโอซินลดลง Lee และคณะ (1997) พบว่า ปริมาณของไมโอซินลดลงและมีแถบของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นในเจลซูริมิจากปลา Alaska pollack ที่เติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ร้อยละ 0.2 Kumazawa (1993) และ Seguro และคณะ (1994) รายงานว่า ปริมาณไมโอซินลดลงโดยมีพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพิ่มขึ้นในซูริมิจากปลา horse mackerel ที่เติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ ส่วนการเติมแฟรกชัน I-S ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 ให้ผลใกล้เคียงกับการเติมที่ระดับร้อยละ 0.2 โดยปริมาณของแอกติน (45 กิโลดาลตัน) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 32 รูปแบบโปรตีนซูริมิปลาตาหวานที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIHยูนิตต่อกรัม แฟรกชัน I-S และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดย gradient SDS-PAGE (5-10% running gel และ 4% stacking gel) โดยใช้ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 เจลซูริมิปลาตาหวานที่ไม่เติมแฟรกชัน I-S

แถวที่ 3 เจลซูริมิปลาตาหวานที่เติมแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2

แถวที่ 4 เจลซูริมิปลาตาหวานที่เติมแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.5

แถวที่ 5 เจลซูริมิปลาตาหวานที่เติมแฟรกชัน I-S ร้อยละ 1

แถวที่ 6 แฟรกชัน I-S

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1 สภาวะที่เหมาะสมของการเติมพลาสมาเลือดหมูต่อความแข็งแรงของเจลซูริมิ คือ การเติมพลาสมาที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 2.5 และเชื้อตัวที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แล้วตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2 พลาสมาเลือดหมูสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์โปรตีเนสจากกล้ามเนื้อและเครื่องในปลาตาหวาน และกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาตาหวานได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพ โดยความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสขึ้นกับความเข้มข้นของพลาสมา

3 การแยกส่วนของพลาสมาเลือดหมูได้แฟรกชัน 5 แฟรกชัน ซึ่งมีผลผลิตดังนี้คือ แฟรกชัน I ร้อยละ 2.19 ของพลาสมา แฟรกชัน II+III ร้อยละ 1.34 ของพลาสมา แฟรกชัน IV ร้อยละ 5 ของพลาสมา แฟรกชัน IV-I ร้อยละ 4.2 ของพลาสมาเลือดหมู และแฟรกชัน I-S ร้อยละ 72.3 ของแฟรกชัน I (โดยน้ำหนักแห้ง)

4 แฟรกชัน I-S มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสสูงสุด แฟรกชัน I มีกิจกรรมรองลงมา โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสเท่ากับ 223.39 ± 14.05 และ 116.44 ± 12.78 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ตามลำดับ

5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I และแฟรกชัน I-S อยู่ในช่วง 35-55 องศาเซลเซียส โดยแฟรกชัน I-S มีกิจกรรมสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส แคลเซียมคลอไรด์สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชัน I และแฟรกชัน I-S ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในแฟรกชันทั้งสองถูกยับยั้งได้โดย NEM EDTA และ NH_4Cl

6 แฟรกชัน IV-I ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์โปรตีเนสจากกล้ามเนื้อและเครื่องในปลาตาหวานสูงสุด และสามารถยับยั้งการย่อยสลายตัวเองได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถป้องกันการย่อย

สลายไมโอซินจากเอนไซม์ภายในกล้ามเนื้อ ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนสและการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาดาทาหวานบดขึ้นกับความเข้มข้นของแฟรกชัน

7 การเติมแฟรกชันที่มีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนส (แฟรกชัน IV-I) ที่ระดับความเข้มข้น 0.3 สามารถยับยั้งการเกิดโมโครีในซูริมิจากปลาดาทาหวาน และให้เจลที่มีความแข็งแรง

8 การเติมแฟรกชันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (แฟรกชัน I-S) ในเจลซูริมิจากปลาดาทาหวานที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในสภาวะที่เคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที มีผลให้เจลซูริมิซึ่งผ่านและไม่ทำให้ความร้อนมีความแข็งแรงสูงสุด โดยสามารถเพิ่มการเชื่อมประสานของไมโอซินเกิดเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2537. สถิติสำหรับการวิจัยทางเกษตร. คณะทรัพยากรธรรมชาติ.
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. 278 หน้า.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2533 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเนื้อ
ปลาสด (ซูริมิ) เยือกแข็ง ม.อ.ก. 935 -2533.
- ไวยุทธ พุทธาริ, วีระวรรณ จุลเกษม และ วิสุทธิ ไบไม้. 2523. การลำเลียงในสิ่งมีชีวิต :
ชีววิทยาเล่มหนึ่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร. 262-306.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2536. ซูริมิและผลิตภัณฑ์จากซูริมิ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 147 หน้า.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล และ วรณพ วิเศษสงวน. 2541. บทบาทของเอนไซม์ในซูริมิ: ซูวาริ.
อาหาร. 28(1):5-15.
- Adam, A., Albert, A., Calay, G., Colset, J., Damas, J. and Franchimont, P. 1985.
Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by
radioimmunoassay and determination of reference values. Clin. Chem. 31: 423-
426.
- Akazawa, H., Miyauchi, Y., Sakurada, K., Wasson, K.H. and Reppond, K.D. 1993.
Evaluation of protease inhibitors in Pacific whiting surimi. J. Aquat. Food
Prod. Technol. 2(3): 79-95.
- An, H., Weerasinghe, V., Seymour, T.A. and Morrissey, M.T. 1994. Cathepsin
degradation of Pacific whiting surimi proteins. J. Food Sci. 59: 1013-
1017,1033.
- Ando, H., Adachi, M., Umead, K., Matsuura, A., Nonaka M., Uchio, R., Tanka, H.
and Motoki, M. 1989. Purification and characteristics of novel
transglutaminase derived from microorganisms. J. Agric. Biol. Chem. 53 :
2613 -2617.

- Araki, H. and Seki, N. 1993. Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 59 : 711-716. /
- Barrett, A.J. and Kirschke, H., 1981. Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L. *Meth. Enzym.* 80: 535-561.
- Barrett, A.J. and Starkey, P.M. 1973. The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinase. *Biochem. J.* 133: 709-724. /
- Benjakul, S., Seymour, T.A., Morrissey, M.T. and An, H. 1997. Physicochemical change in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *J. Food Sci.* 62: 729-733.
- Boye, S.W. and Lanier, T.C. 1988. Effects of heat-stable alkaline protease activity of Atlantic menhaden (*Brevoorti tyrannus*) on surimi gels. *J. Food Sci.* 53: 1340-1342, 1398.
- Brenner, S. and Wold, F. 1978. Human erythrocyte transglutaminase purification and properties. *Biochem. Biophys. Acta.* 522: 74-83. /
- Buck, E.M. and Fafard, R.D. 1985. Development of a frankfurter analog from red hake surimi. *J. Food Sci.* 50: 321-324.
- Chang-Lee, M.V., Lampila, L.E. and Crawford, D.L. 1990. Yield and composition of surimi from Pacific whiting (*Merluccius productus*) and the effect of various protein additives on gel strength. *J. Food Sci.* 55: 83-86.
- Chang-Lee, M.V., Pacheco-Aguilar, R., Crawford, D.L. and Lampila, L.E. 1989. Proteolytic activity of surimi from Pacific whiting (*Merluccius productus*) and heat set gel texture. *J. Food Sci.* 54: 1116-1119, 1124.
- Chawla, S. P., Venugopal, V. and Nair, P. M. 1996. Gelation of protein from washed muscle of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) under mild acidic condition. *J. Food Sci.* 61: 362-366, 371.
- Cohn, E.J., Strong, L.E. Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M. and Taylor, H.L. 1946. Preparation and properties of serum and plasma protein. IV.

- A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein component of biological tissues and fluids. *J. Amer. Chem. Soc.* 68: 459-475. ✓
- Credo, R.B. , Curtis ,C.G. and Lorand, L. 1978. Ca^{2+} -related regulatory function of fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75 : 4234-4237.
- De-Backer-Royer, C., and Meunier, J.C. 1992. Effect of temperature and pH on Factor XIII_a from human placenta. *Int. J. Biochem.* 24: 637-642.
- De-Backer-Royer ,C., Traore, F. and Meunier, J.C. 1983. Purification and properties of Factor XIII from human placenta. *Int. J. Biochem.* 24: 91-97.
- De-Backer-Roger, C., Traore, F. and Meunier, J.C. 1992. Polymerization of meat and soybean proteins by human placental calcium-activated Factor XIII. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2025-2056.
- Delaney, R.A.M. 1977. Protein concentrates from slaughter animal blood I. Preparation and purification of red blood cell concentrates. *J. Food Tech.* 12: 339-354.
- ✓ Donnelly, E.B. and Delaney, R.A.M. 1977. The fractionation of porcine plasma by potential food industrial techniques. *J. Food Technol.* 12: 493-503. ✓
- Erlanger, B.F., Kokowksy, N., and Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.
- Faraji, H. and Decker, A.E. 1991. Inhibition of phosphatidylcholine liposome oxidation by porcine plasma. *J. Food Sci.* 56: 1038-1042 ✓
- Foegeding, E.A., Allen, C.E. and Dayton, W.R. 1986. Effect of heating rate on thermally formed myosin fibrinogen and albumin gels. *J. Food Sci.* 51: 104-108. ✓
- Folk, J.E. 1980. Transglutaminase. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 517-531. ✓
- Folk, J.E. and Chung, S.E. 1973. Molecular and catalytic properties of transglutaminase. *Adv. Enzym.* 38: 109-191. ✓

- Fretheim, K., Egelanddal, B., Harbitz, O., and Samejima, K. 1985. Slow lowering of pH induces gel formation of myosin. *Food Chem.* 18: 169-178.
- Funatsu, Y. and Aria, K. 1991. The pH-dependence of changes in gel forming ability and myosin heavy chain of salt-ground meat from walleye pollack. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 57: 1973-1980.
- Funatsu, Y., Hosokawa, H., Nanbu, S., and Arai, K. 1993. Effect of sorbitol on gelation and cross-linking of myosin heavy chain of salt-ground meat from walleye pollack. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 59: 1599-1607.
- Gahne, B. and Juneja, R. K. 1985. Close genetic linkage between four plasma α -protease loci (Pil, PolA, PolB, Pi2) in pigs. *Prot Biol Fluids.* 33: 19-122. /
- Greene, D.H. and Babitt, J.K. 1990. Control of muscle softening and protease-parasite interaction in arrowtooth flounder (*Atheresinghe stomias*). *J. Food Sci.* 55: 579-580.
- Greenberg, C. S., Birckbichler, P. and Rice, R.H. 1991. Transglutaminase: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* 5: 3071-3077. /
- Greenberg, C.S. and Shuman, M.A. 1982. The zymogen forms of blood coagulation factor XIII bind specifically to fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 257: 6096-6101. /
- Gilleland, G.M., Lanier, T.C. and Hamann, D.D. 1997. Covalent bonding in pressure-induced fish protein gels. *J. Food Sci.* 62: 713-716, 733. /
- Hamada, M. 1992. Mechanical behavior and cross linkages of heat-induced myosin gel. *Nippon Suisun Gakkaishi.* 58: 89-93.
- Hamann, D.D., Amato, P.M., Wu, M.C. and Foegeding, E.A. 1990. Inhibition of modori (gel weakening) in surimi by plasma hydrolysate and egg white. *J. Food Sci.* 55: 665-669, 795. /

- Harpel, P.C. and Brower, M.S. 1983. α_2 -macroglobulin: an introduction. *In*: Chemistry and biology of α_2 -macroglobulin. (eds. B. Boland, J. Hitchcock, and R. Scholnick) pp. 1-9. New York.
- Hossain, M. S., Ito, T., Kanoh, S. and Niwa, E. 1998. Incorporation of dansyl glutamine into muscle protein during incubating of fish flesh sol at 30 °C. *Fisheries Sci.* 64: 95-98.
- Ichinose, A. and Davie, E.W. 1988. Characterization of the gene for the a subunit of human Factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5829-5833.
- Jiang, S.T. and Lee, J.J. 1992. Purification, characterization, and utilization of pig plasma Factor XIII_a. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1101-1107.
- Jiang, S.T., Wang, Y.T., Gau, B.S. and Chen, C.S. 1990. Role of pepstatin-sensitive protease on the post-mortem changes of tilapia muscle myofibrils. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1664-1668.
- Jobling, A. 1986. Recovery and utilization of edible protein. *In*: development in food Protein. (ed. B.J.F. Hudson) 4th, pp. 49-52. London.
- Johnson, L.A., Hanel, E.F. and Hosoney. 1979. Bovine plasma as a replacement for egg in cakes. *Cereal Chem.* 56(4): 339-342.
- Kamath, G.G., Lanier, T.C. Foegeding, E.A. and Hamann, D.D. 1992. Nondisulfide covalent cross-linking of myosin heavy chain in "setting" of Alaska pollock and Atlantic croaker surimi. *J. Food Biochem.* 16: 151-172.
- Kimura, I., Sugimoto, M., Toyoda, K., Seki, N., Arai, K. and Fujita, T. 1991. A study on the cross-linking reaction of myosin in kamaboko "Suwari" gels. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 57: 1389-1396.
- Kolodziejaska, I. and Sikorski, Z.E. 1996. Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates : a review. *J. Food Biochem.* 20: 349-363.

- Kumazawa, Y., Sakamoto, H., Kawajiri, H., Seguro, K. and Motoki, M. 1996. Determination of ϵ -(γ -glutamyl)lysine in several fish egg and muscle proteins. *Fisheries Sci.* 62: 331-332.
- Kumazawa, Y., Sakamoto, H., Kawajiri, H., Seguro, K. and Motoki, M. 1995. Suppression of surimi gel setting by transglutaminase inhibitors. *J. Food Sci.* 60: 715-717, 726.
- Kumazawa, Y., Seguro, K., Takamura, M. and Motoki, M. 1993. Formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-linking in cured horse mackerel meat induced by curing. *J. Food Sci.* 58: 1062-1067.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J. and Soeda, T. 1996. The usefulness of transglutaminase for food processing. *American Chemical Society.* 29-38. /
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:^{680 685}~~860-865~~.
- Lanier, T.C. 1992. Measurement of surimi composition and functional properties. *In: Surimi Technology.* (ed. T.C. Lanier and C.M. Lee). pp. 123-163. New York.
- Lanier, T.C., Lin, T.S., Liu, Y. M. and Hamann, D.D. 1982. Heat gelation properties of actomyosin and surimi prepared from Atlantic croaker. *J. Food Sci.* 47: 1921-1925.
- Lanier, T.C., MacDonald, G.A. and Scott, D.N. 1988. Surimi technology workshop notes. Nelson, New Zealand, July 19-21, 1988. 131 pp.
- Lee, H.G., Lanier, T.C., Hamann, D.D., and Knopp, J.A. 1997. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J. Food Sci.* 62: 20-24. /
- Loewry, A.G., Dahlberg, A., Dunathan, K., Kriel, R. and Wolfinger, H. L. 1961. Fibrinase II. Some physical properties. *J. Biol. Chem.* 236: 2634-2643. /
- Lowry, Q.H., Rosebrough N. J., Farr, L. A. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 256-275.

- Loffler, A. 1986. Proteolytic enzymes: sources and application. *Food Technol.* 40: 63-70.
- Lorand, L. 1986. Activation of blood coagulation Factor XIII. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 144-158. ✓
- Lorand, L. and Campbell, L.K. 1971. Transamidating enzymes: rapid chromatographic assays. *Anal. Biochem.* 44: 207-211. ✓
- Lorand, L. and Gotoh, T. 1970. Fibrinoligase: The fibrin stabilizing factor system. *Meth. Enzym.* 19: 770-782.
- Lorand, L. and Jacobsen, A. 1958. Studies on the polymerization of fibrin. The role of the globulin: Fibrin-stabilizing factor. *J. Biol. Chem.* 230: 421-434.
- Lorier, M.A. and Aitken, B.L. 1991. Method for treating fish with α_2 -macroglobulin. U.S. Patent . 5,013,568. ✓
- ✓Mahmoud, R. and Savello, P.A. 1993. Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic cross-linking of whey protein. *J. Dairy Sci.* 76: 29-35. ✓
- Makinodam, Y., Kyaw, N.N. and Ikeda, S. 1982. Classification of carp muscle alkaline proteinase and its action against intracellular protein. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48 : 479-483.
- Martone, C.B., Busconi, L., Folco, E.J. and Sanghez, J.J. 1991. Detection of a trypsin-like serine protease and its endogenous inhibitor in hake skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 289: 1-5.
- Min, T.S., Chung, N.M., Fujiwara, T., Kuang, H.K. and Hasegawa, H. 1987. Handbook on the processing of frozen surimi and fish jelly product in Southeast Asia. Koon Wah Printing Pte Ltd Singapore. 30 pp.
- Morrissey, M.T., Hartley, P.S. and An, H. 1995. Proteolytic activity in Pacific whiting and effects of surimi processing. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 4(4): 5-18.

- Morrissey, M.T., Wu, J.W., Lin, D. and An, H. 1993. Proteinase inhibitor effects on torsion measurement and autolysis of Pacific whiting surimi. *J. Food Sci.* 58: 1050-1054.
- Muller-Eaterl, W., Just, I. and Fritz, H. 1984. Quantitation and differentiation of human kinonogens by enzyme-linked immunosorbant assays. *Fresenius'Z. Anal. Chem.* 317: 733-734.
- Mulvihill, D. and Kinsella, J.E. 1987. Gelation characterization of whey protein and β -Lactoglobulin. *Food Technol.* 41(3): 102-110.
- Nowasad, A. AKM, Kanoh, S. and Niwa, E. 1994. Setting of surimi paste in which transglutaminase inactivated by p -chloromercuribenzoate. *Fisheries Sci.* 60: 185-188.
- Nowasad, A., Kanoh, S. and Niwa, E. 1993. Electrophoretic behavior of cross-linked myosin heavy chain in suwari gel. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 59: 667-671.
- Nishimoto, S., Hashimoto, A., Seki, N., Kimura, I., Toyoda, K., Fujita, T. and Arai, K. 1987. Influencing factors on changes in myosin heavy chain and jelly strength of salted meat paste from Alaska pollack during setting. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 53: 2011-2020.
- Niwa, E. 1992. Chemistry of surimi gelatin. *In: Surimi Technology*, (ed. T.C. Lanier and C.M. Lee)pp. 289-328. New York.
- Numakura, T., Seki, N., Kimura, I., Toyoda, K., Fujita, T. and Arai, K. 1985. Cross-linking reaction of myosin in the fish paste during setting (suwari). *Nippon Suisan Gakkaishi.* 51: 1559-1565.
- Park, J.W. 1994. Functional protein additives in surimi gel. *J. Food Sci.* 59: 525-527.
- Park, J.W., Yongsawatdigul, J. and Lin, T.M. 1994. Rheological behavior and potential cross-linking of Pacific whiting (*Merluccius productus*) surimi gel. *J. Food Sci.* 59: 773-776.

- Pennel, R.B. 1960. Fractionation and isolation of purified components by precipitation methods. *In: The Plasma proteins : Isolation, Characterization, and Function.* (ed. F. W. Putnam) vol.1, pp.9-50. New York.
- Pigott, G.M. and Taker, B.W. 1990. *Seafood : Effect of Technology in Nutrition.* Marcel Dekker, Inc. USA. 362 pp.
- Porter, R.W., Koury, B. and Kudo, G. 1993. Inhibition of protease activity in muscle extracts and surimi from Pacific whiting (*Merluccius productus*) and arrowtooth flounder (*Atheresthes atomias*). *Mar. Fish. Rev.* 55: 10-15.
- Rodger, G.W. and Wilding, P. 1990. Muscle proteins. *In: Surimi Technology.* (ed. Harris, P.)pp.361-400. London.
- Roussel, H. and Cheftel, J.C. 1990. Mechanism of gelation of sardine protein: Influence of thermal processing and various additives on the texture and protein solubility of kamaboko gel. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25: 260-280.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Toiguchi, S., Seguro, K., Soeda, T. and Motoki, M. 1995. Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. *J. Food Sci.* 60: 300-304.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y. and Motoki, M. 1994. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction condition. *J. Food Sci.* 59: 866-871.
- Seki, N., Uno, H., Lee, N.H., Kimura, I., Toyoda, K., Fujita T., and Arai, K. 1990. Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 56: 125-132.
- Seguro, K., Kamazawa, Y., Kawajiri, H., Sakamoto, H. and Motoki, M. 1994. Roles of ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-links formed by a microbial transglutaminase and distribution of the crosslink in various food. Paper no.11-9, presented at 54th Annual Meeting of Inst. of Food Technologists, Atlanta, June 25-29.

- Seguro, K., Kamazawa, Y., Ohtsuka, T., Toiguchi, S. and Motoki, M. 1995. Microbial transglutaminase and ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link effects on elastic properties of kamaboko gels. *J. Food Sci.* 60 : 305-311.
- Seymour, T.A., Morrissey, M.T., Peters M.Y. and An, H. 1994. Purification and chracterization of Pacific whiting protein. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2421-2427.
- Seymour, T.A., Peter, M.Y., Morrissey, M.T. and An, H. 1997. Surimi gel enhancement by bovine plasma proteins. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2919-2923.
- Shen, L. and Lorand, L. 1983. Contribution of fibrin stabilization to clot strength. *J. Clin. Invest.* 71: 1336-1341.
- Shimizu, Y. 1976. White meat fish and red meat fish. *In: Japan Soc. Sci. Fish.* (ed. K.K. Tokyo) pp.106-118. Cited by Suzuki, T. 1981. Fish and krill protein. Processing technology. Applied Science Publishers Ltd. London. 260 pp.
- Smith, D.M. 1991. Factor influencing heat induce gelation of muscle proteins. In Interactions of food protein.(ACS Symposium series No. 454) (ed. N. Parris and R. Bar ford)pp. 243-256. Washington DC : American Chemical Society.
- Sottrup-Jensen, L., Stepanik, T.M., Wierzbicki, D.M., Jones, C.M., Lonblad, P.B., Kristensen, T., Mortensen, S.B., Petersen, T.E. and Magnusson, S. 1983. The primary structure of α_2 -macroglobulin and localization of a Factor XIII_a cross-linking site. *In: Chemistry and Biology of α_2 -macroglobulin.* (ed. R. Feinman). New York.
- Strakey, P.M. and Barrett, A.J. 1977. α_2 -macroglobulin, a physiological regulator of proteinase activity. *In: Proteinase in Mammalian Cells and Tissues.* (ed. A. J., Barrett) Chapter 16, pp. 663-696. New York.
- Stroder, W. and Hormann, H. 1974. The cold-insoluble fibrinogen fraction of bovine and human plasma. *Biochem. Biophys. Acta.* 351: 396-406. ✓

- Su, H., Lin, T.S. and Lanier, T.C. 1981. Investigation into potential sources of heat-stable alkaline protease in mechanically separated Atlantic croaker (*Micropogon undulatus*). J. Food Sci. 46: 1654-1656, 1664.
- Suzuki, T. 1981. Fish and Krill processing technology. London: Applied Science Publishers Ltd. London. 260 pp.
- Takagi, T. and Doolittle, R.F. 1974. Amino acid sequence studies of Factor XIII and the peptide released during its activation by thrombin. Biochemistry. 13: 750-756.
- Takahashi, N., Takahashi, Y. and Putnam, F.W. 1986. Primary structure of blood coagulation factor XIII_a (fibrinoligase, transglutaminase) from human placenta. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 8019-8023. ✓
- Tamaki, T. and Aoki, N. 1985. Cross-linking of α_2 -plasmin inhibitor to fibrin catalyzed by activated fibrin-stabilizing factor. J. Biol. Chem. 257: 14767-14772.
- Traore, F. and Meunier, J. 1992. Cross-linking activity of placental Factor XIII_a on whey protein and casein. J. Agric. Food Chem. 40: 399-402.
- ✓ Tsai, G.J., Lin, M.S. and Jiang, T.S. 1996. Transglutaminase from *Streptoverticillium ladacanicum* and application to minced fish product. J. Food Sci. 61: 1234-1238. ✓
- ✓ Tsukamasa, Y., Sato, K., Shimizu, Y., Imai, C., Sugiyama, M., Minegishi, Y., and Kawabata, M. 1993. ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link formation in sardine myofibril sol during setting at 25 °C. J. Food Sci. 58: 785-787. ✓
- Tsukamasa, Y. and Shimizu, Y. 1990. Setting property of sardine and Pacific mackerel meat. Nippon Suisan Gakkaishi. 56: 1105-1112. ✓
- Wan, J., Kimura, I., Satake, M. and Seki, N. 1994. Effect of calcium ion concentration on the gelling properties and transglutaminase activity of walleye pollack surimi paste. Fisheries. Sci. 60: 107-113. ✓

- Wasson, D.H., Reppound, K.D., Babbitt, J.K. and French, J.S. 1992. Effects of additives on proteolytic and functional properties of arrowtooth flounder surimi. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 1(3): 147-165.
- Weerasinghe, V.C., Morrissey, M.T. and An. H. 1995. Characterization of active components in food-grade protease inhibitor for surimi manufacture. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2584-2590.
- Whitaker, J.R. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. 2nd pp. 472-475. Marcel Dekker, Inc. New York. ✓
- White, A., Handler, P. and Smith, E. 1973. Principles of Biochemistry (5th edition). pp. 820-823. McGraw-Hill Book Company. New York.
- Wierrbicki, E and Deatherage, F.E. 1958. Determination of water holding capacity of fresh meats. *J. Agric. Food Chem.* 58: 387.
- Zahangir-Hossain, S.M., Ito, T., Kanoh, S. and Niwa, E. 1998. Incorporation of dansyl glutamine into muscle protein during incubation of fish flesh sol at 30 °C. *Fisheries Sci.* 64: 95-98.
- Ziegler, G.R. and Foegeding, A. 1991. The gelation of proteins. *In: Advances in Food and Nutrition Research.* (ed. J. E. Kinsellar) vol. 34, pp. 243-256. USA.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การตรวจสอบคุณภาพของเจลซูริมิ

ก1. การวัดค่าความขาว

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดสี ยี่ห้อ JUKI รุ่น JP7100F

วิธีการ

1. เปิดเครื่องวัดสีและเครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อทำการวัดสีในระบบ Hunter
2. ทำการคาลิเบรตเครื่อง โดยใช้แผ่นคาลิเบรตสำหรับของแข็ง
3. วัดค่าสีตัวอย่าง โดยระบบ Hunter color scale ซึ่งให้ค่าสีคือ L a และ b
เมื่อ L แสดงถึงความสว่าง (lightness) มีค่าตั้งแต่ 0-100
a แสดงถึงสีแดง (+) หรือสีเขียว (-)
b แสดงถึงสีเหลือง (+) หรือสีน้ำเงิน (-)
4. นำค่าที่ได้มาคำนวณ ความขาว (Whiteness) โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร

(Laniar and Lee, 1992)

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

ก2. การวัดความแข็งแรงของเจลซูริมิ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Texture Analyzer ยี่ห้อ STABLE MICRO SYSTEM รุ่น TA-XT2
2. เครื่องคอมพิวเตอร์

วิธีการ

1. ติดตั้งเครื่องวัดเนื้อสัมผัสเข้ากับเครื่องคอมพิวเตอร์ ทำการเปิดเครื่องวัดเนื้อสัมผัสและคอมพิวเตอร์

2. ทำการคาลิเบรตเครื่องวัดเนื้อสัมผัสโดยใช้ลูกตุ้มหนัก 5 กิโลกรัม

3. ติดหัวเข็มขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วทำการคาลิเบรตหัวเข็ม

4. ตั้งสภาวะของเครื่องวัดเนื้อสัมผัสสำหรับวัดเจลซูริมิ

Pre-Test Speed: 1.5 mm/s

Test Speed: 1.5 mm/s

Post-Test Speed: 10.0 mm/s

Distance: 30 mm

Trigger Type Auto-40 g

Data Acquisition Rate: 200pps

5. เตรียมตัวอย่าง โดยการตัดให้มีความยาว 2.5 เซนติเมตร วางลงบนฐานวางตัวอย่าง และวัดค่าความแข็งแรงโดยให้หัวเข็มเจาะทะลุตรงกลาง

6. ประมวลผลการวัดที่ได้ โดยอ่านค่าแรงเจาะทะลุ (Breaking force) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (Deformation)

ก3. การวัดการละลาย (Roussel and Cheftel, 1990)

อุปกรณ์

1. เครื่องกวนชนิดแม่เหล็กไฟฟ้า และแท่งกวนแม่เหล็ก

2. หลอดทดลอง และ ขวดรูปชมพู่

3. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้

4. เครื่องไฮโมจิไนส์

สารเคมี

1. สารละลายต่างๆ

S1: โปแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์

S2: ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8

S3: S2 ที่มีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตร้อยละ 1

S4: S2 ที่มีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตร้อยละ 1 และยูเรีย 8 โมลาร์

S5: S2 ที่มีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตร้อยละ 1 ยูเรีย 8 โมลาร์ และเบต้า-เมอแคปโตเอทานอลร้อยละ 2

2. กรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 50 และ ร้อยละ 10 (4 องศาเซลเซียส)

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม บดให้ละเอียด ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลาย (S1 S2 S3 S4 S5) จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ

โซโมจิไนส์ เป็นเวลา 1 นาที

3. การละลายในสารละลาย S5 ต้องแช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

4. จากนั้นนำทุกตัวอย่างมาควนบนเครื่องควนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

5. นำสารผสมที่ได้มาเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 10,000xg เป็นเวลา 30 นาที

6. นำส่วนใสที่ได้ 10 มิลลิลิตร เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 50 จำนวน 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

7. นำสารผสมที่ได้มาเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 10,000xg เป็นเวลา 30 นาที และล้างตะกอนที่ได้ด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 10

8. นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์

9. ตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (ภาคผนวก ง.1.) เปรียบเทียบปริมาณ

โปรตีนกับกราฟมาตรฐานของ BSA

ชุดควบคุม: ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ แทนสารละลายต่างๆ แล้วทำการละลาย เช่นเดียวกับตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละของการละลาย} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างในสารละลาย} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนของชุดควบคุม}}$$

ก4. การตรวจสอบปริมาณของเหลวจากการบีบอัด

(ดัดแปลงจาก Wierbicki and Deatherage, 1958)

อุปกรณ์

1. ลูกตุ้มน้ำหนัก 5 กิโลกรัม
2. กระดาษกรอง (Whatman No.1)
3. นาฬิกาจับเวลา
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. ตัดตัวอย่างเจลซูริมิให้มีความหนา 0.5 เซนติเมตร
2. นำตัวอย่างมาชั่ง (A)
3. นำตัวอย่างมาวางบนกระดาษกรอง 3 แผ่น และปิดทับด้วยการกระดาษกรองอีก

2 แผ่น

4. วางตุ้มน้ำหนัก 5 กิโลกรัม ทับตัวอย่าง เป็นเวลา 30 วินาที
5. แล้วนำตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก (B)

การคำนวณ

$$\text{ของเหลวจากการบีบอัด (ร้อยละ)} = (A-B)/A \times 100$$

ภาคผนวก ข. การสกัดเอนไซม์

ข1. การเตรียมเอนไซม์จากเครื่องในปลา

อุปกรณ์

1. เครื่องโฮโมจิไนส์
2. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้
3. กระดาษกรอง (Whatman No. 4)

วิธีการ

1. นำเครื่องในปลาดาทาหวาน (ไม่รวมกระเพาะปลา) ที่ล้างสะอาดผสมกับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1 ต่อ 2 (น้ำหนัก / ปริมาตร) คนให้เข้ากัน แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องโฮโมจิไนส์
2. นำสารผสมที่ได้มาเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. กรองแยกส่วนใสเพื่อแยกไขมันที่ปะปน และส่วนใสที่ได้ใช้เป็นแหล่งเอนไซม์โปรตีนสจากเครื่องในปลา

ข2. การสกัดเอนไซม์จากกล้ามเนื้อปลา

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้

วิธีการ

1. นำปลาดาทาหวานสดมาแล่เอาเฉพาะส่วนของเนื้อ
2. ล้างให้ละเอียด
3. นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5,000xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
4. แยกส่วนใสเพื่อใช้เป็นเอนไซม์โปรตีนสจากกล้ามเนื้อปลา

ภาคผนวก ค. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส

ค1. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ปาเปน (Barett and Kirschke, 1981)

อุปกรณ์

1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
2. นาฬิกาจับเวลา
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
4. Vortex mixer

สารเคมี

1. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ร้อยละ 2 ในเอทานอล
2. สารละลาย pDACA เข้มข้น ร้อยละ 0.06 ในเอทานอล
3. สารละลาย B :
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.25 โมลาร์ พีเอช 6.0 ที่มี EDTA 25 มิลลิ

โมลาร์

4. สารละลาย S :

NO₂-Benzoyl-DL-arginine-β-naphthylamide (BANA) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMF) (เจือจางด้วยน้ำ โดยใช้ BANA 70 ไมโครลิตร ต่อน้ำ 1000 ไมโครลิตร)

5. สารละลาย E :

ละลายเอนไซม์ปาเปนเข้มข้น 40 ไมโครกรัมใน 1 มิลลิลิตร ของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.25 โมลาร์ พีเอช 7.0 ที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล 20 มิลลิ

โมลาร์

6. สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส (พลาสมาเลือดหมู) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

วิธีการ

1. ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนส 200 ไมโครลิตร สารละลาย E จำนวน 100 ไมโครลิตร และ สารละลาย B จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
2. นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
3. เติมสารละลาย S จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 2 ในเอธานอล จำนวน 1000 ไมโครลิตร
5. เติมสารละลาย pDACA เข้มข้นร้อยละ 0.06 ในเอธานอลจำนวน 1000 ไมโครลิตร
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การเตรียมชุดควบคุม :

1. ชุดควบคุม (Positive Control) : เติมน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร แทนสารยับยั้งเอนไซม์ปาเปน
2. Blank ของชุดควบคุม : เตรียมเหมือนชุดควบคุม แต่ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 2 ในเอธานอล จำนวน 1000 ไมโครลิตร ก่อนการเติมสารละลาย S
3. Blank ของตัวอย่าง : เตรียมเหมือนตัวอย่าง แต่ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 2 ในเอธานอล จำนวน 1000 ไมโครลิตร ก่อนการเติมสารละลาย S

การคำนวณกิจกรรมการยับยั้ง

กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์รายงานในรูปร้อยละการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ปาเปนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (\%)} = \frac{(\text{ODของชุดควบคุม} - \text{ODของตัวอย่าง}) \times 100}{\text{OD ของชุดควบคุม}}$$

เมื่อ

ODของชุดควบคุม = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม - ค่าการดูดกลืนแสงของ
Blank ของชุดควบคุม

ODของตัวอย่าง = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง - ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank
ของตัวอย่าง

ค2. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (Erlanger *et al.*, 1961)

อุปกรณ์

1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
2. นาฬิกาจับเวลา
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
4. Vortex mixer

สารเคมี

1. สารละลายเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.2
2. N α -Benzoyl-DL-arginine-p-notroaniline (BAPNA) เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ
มิลลิลิตร ใน dimethyl sulfoxide (DMF) (เจือจางก่อนการใช้ให้ได้ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม
ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.2
ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9)
3. กรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 30 โดยปริมาตร
4. สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส (พลาสติกเลือดหมู) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

วิธีการ

1. ดูดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ระดับความเจือจางต่างๆ 200 ไมโครลิตร ใส่
หลอดทดลอง

2. เติมสารละลายเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร ผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
3. บ่มสารละลายผสมในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลาย BAPNA เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 30 จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

การเตรียมชุดควบคุม :

1. ชุดควบคุม (Positive Control) : เติมน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร แทนสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน
2. Blank ของชุดควบคุม : เตรียมเหมือนชุดควบคุม แต่ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 30 จำนวน 200 ไมโครลิตร ก่อนการเติม BAPNA
3. Blank ของตัวอย่าง : เตรียมเหมือนตัวอย่าง แต่ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 30 จำนวน 200 ไมโครลิตร ก่อนการเติม BAPNA

การคำนวณกิจกรรมการยับยั้ง

กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์รายงานในรูปร้อยละการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (\%)} = \frac{(\text{ODของชุดควบคุม} - \text{ODของตัวอย่าง}) \times 100}{\text{OD ของชุดควบคุม}}$$

เมื่อ

$$\text{ODของชุดควบคุม} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank ของชุดควบคุม}$$

ODของตัวอย่าง = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง – ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank
ของตัวอย่าง

ค3. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนสจากเครื่องในและกล้ามเนื้อปลา (An et al., 1994)

อุปกรณ์

1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
2. นาฬิกาจับเวลา
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
4. Vortex mixer
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ

สารเคมี

1. สารละลายเคซีนที่ความเข้มข้น ร้อยละ 2
2. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 50 (4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้)
3. สารละลาย cocktail (สารละลายเคซีนเข้มข้นร้อยละ 2 จำนวน 225 ไมโครลิตร สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.2 จำนวน 625 ไมโครลิตร น้ำกลั่น จำนวน 200 ไมโครลิตร)
4. สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนส (พลาสมาเลือดหมู) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

วิธีการ

1. นำสารละลาย cocktail ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ)
2. นำสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนส 100 ไมโครลิตร และเอนไซม์โปรตีนเนสจากเครื่องในปลาหรือกล้ามเนื้อปลา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. เติมสารละลาย cocktail 1000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4. หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 50 จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer

5. นำไปเหวี่ยงแยกโดยเครื่องเหวี่ยงแยกแบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็วรอบ 3,000xg เป็นเวลา 10 นาที

6. นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซิน (ภาคผนวก ง2.)

การเตรียมชุดควบคุม :

1. ชุดควบคุม (Positive Control) : เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร แทนสารยับยั้ง เอนไซม์โปรตีนเอส

2. Blank ของชุดควบคุม : เตรียมเหมือนชุดควบคุม แต่ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 200 ไมโครลิตร ก่อนการเติม cocktail

3. Blank ของตัวอย่าง : เตรียมเหมือนตัวอย่าง แต่ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 200 ไมโครลิตร ก่อนการเติม cocktail

คำนวณกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (\%)} = \frac{(\text{ไทโรซินของชุดควบคุม} - \text{ไทโรซินของตัวอย่าง}) \times 100}{\text{ไทโรซินของชุดควบคุม}}$$

ก4. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งการย่อยสลายตัวเองในกล้ามเนื้อปลา

(Morrissey *et al.*, 1993)

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3. นาฬิกาจับเวลา
4. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. แท่งแก้วคน
6. เครื่องโฮโมจีไนส์

สารเคมี

1. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 5
2. สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส (พลาสติกอลด์ฮูม) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

วิธีการ

1. นำเนื้อปลาตาหวานบดมา 3 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส 3 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นแผ่เนื้อปลาให้กระจายไปทั่วทั้งบีกเกอร์
2. บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 5 จำนวน 27 มิลลิลิตร นำมาโฮโมจีไนส์เป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. เหยียงแยกที่ความเร็วรอบ 5,000xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. นำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method (ภาคผนวก ง2.)

การเตรียมชุดควบคุม :

1. ชุดควบคุม (Positive Control) : เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร แทนสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส
2. Blank ของชุดควบคุม : เตรียมเหมือนชุดควบคุม แต่บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส
3. Blank ของตัวอย่าง : เตรียมเหมือนตัวอย่าง แต่นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

คำนวณกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (\%)} = \frac{(\text{ไทโรซินของชุดควบคุม} - \text{ไทโรซินของตัวอย่าง}) \times 100}{\text{ไทโรซินของชุดควบคุม}}$$

ภาคผนวก ง. การวิเคราะห์โปรตีน

ง1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท

อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. นาฬิกาจับเวลา
3. Vortex mixer
4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

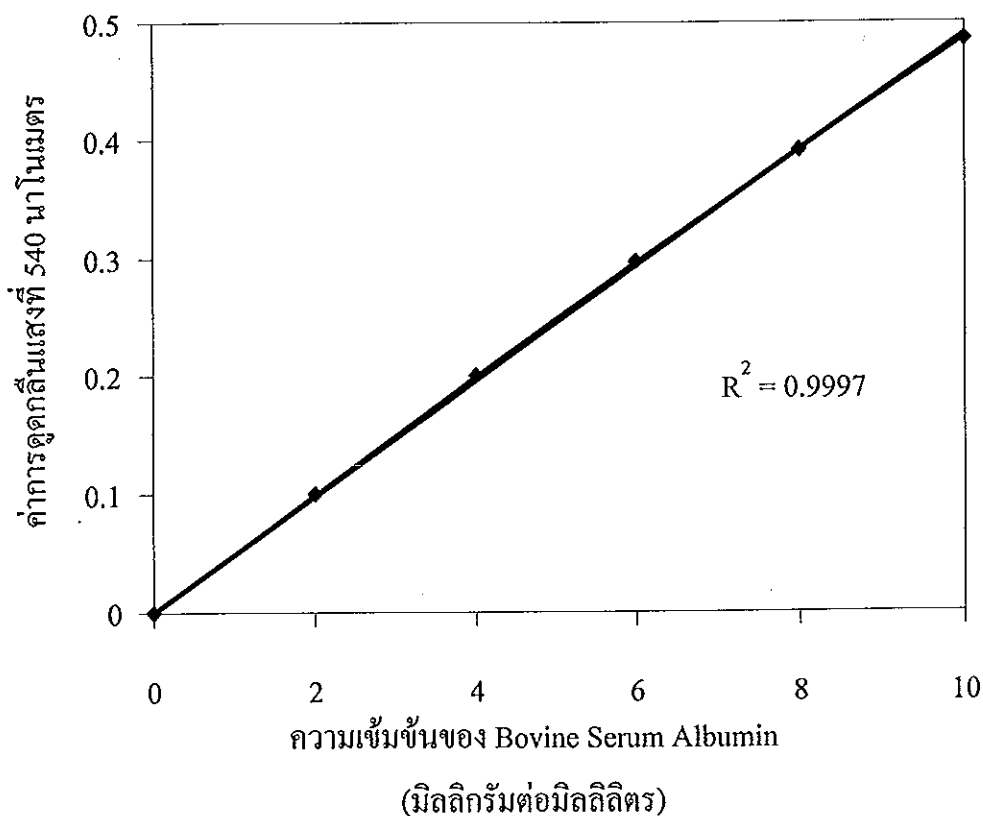
1. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายไบยูเรท : ชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมทาทเรท 6.0 กรัม เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10 จำนวน 300 มิลลิลิตร ในขณะที่กวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (รูปภาคผนวก ง1.)

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

ดูดสารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นโดยปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer วางทิ้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



รูปภาคผนวก ง1. กราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin

ง2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method (Lowry *et al.*, 1951)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. Vortex mixer
3. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
4. นาฬิกาจับเวลา

สารเคมี

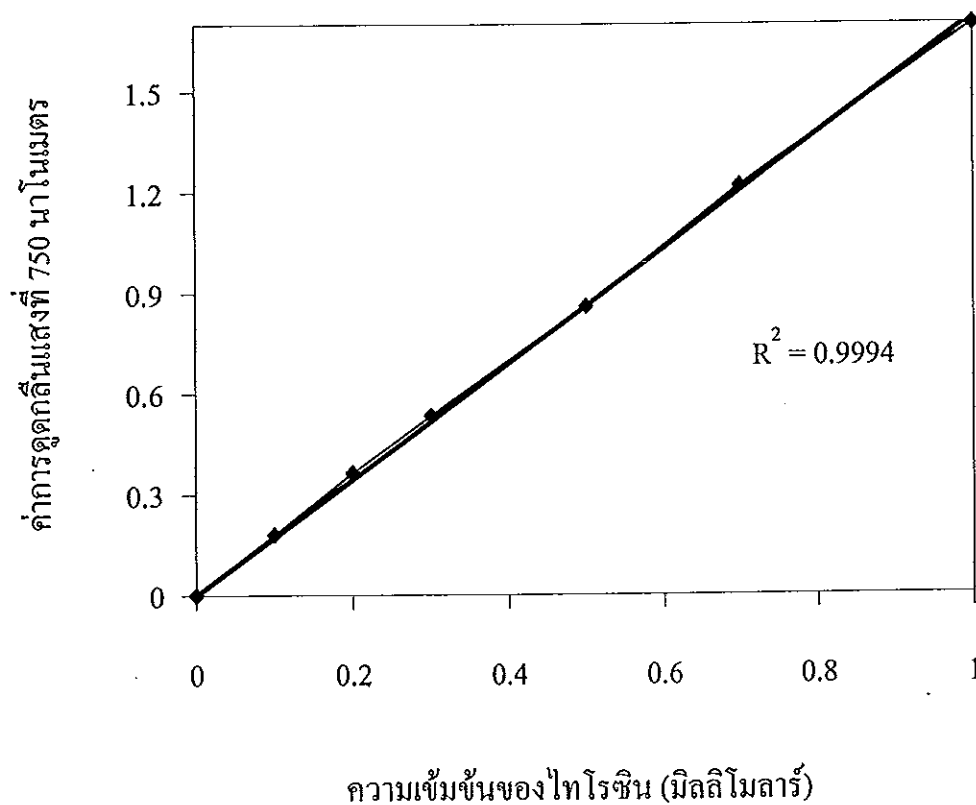
1. สารละลาย A : โซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1
3. สารละลาย C : นำสารละลายฟอสฟีนีนอล 2 นอร์มอล มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น (1 ต่อ 1) ก่อนใช้
4. สารละลาย D : นำสารละลาย B จำนวน 1 มิลลิลิตร + สารละลาย A จำนวน 50 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย D จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex mixer ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
2. เติมสารละลาย C 200 ไมโครลิตร ลงไปในของผสมข้อ 1 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
3. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซิน

การเตรียมกราฟมาตรฐาน :

1. เตรียมสารละลายไทโรซีน 1 มิลลิโมลาร์
2. ดูดละลายไทโรซีน 0, 20, 40, 60, 100, 140 และ 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 ไมโครลิตร
3. นำสารละลายไทโรซีนจากข้อ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาหาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับตัวอย่าง
4. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสง (รูปภาคผนวกที่ 2)



รูปภาคผนวกที่ 2. กราฟมาตรฐานไทโรซีน

ภาคผนวก จ. การแยกส่วนองค์ประกอบของพลาสมา (ดัดแปลงจาก Cohn *et al.*, 1946;
Seymour *et al.*, 1997)

อุปกรณ์

1. เครื่องกวนชนิดแม่เหล็กไฟฟ้า และแท่งกวนแม่เหล็ก
2. เทอร์โมมิเตอร์ (-10 ถึง 50 องศาเซลเซียส)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้
4. พีเอชมิเตอร์
5. Freeze-dryer
6. นาฬิกาจับเวลา

สารเคมี

1. เอทานอล (แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนการใช้งาน)
2. โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.4 โมลาร์ พีเอช 3.8
3. ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7

วิธีการทดลอง

1. นำพลาสมามาเติมเอทานอล (เย็น) ให้มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส กวน เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้มาเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 2,500xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตะกอนที่ได้คือ แฟรกชัน I
2. นำส่วนใสจากข้อ 1 มาเติมเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส กวน เป็นเวลา 30 นาที เหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 2,500xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตะกอนที่ได้คือ แฟรกชัน II+III
3. นำส่วนใสจากข้อ 2 เติมเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 40 แล้วปรับพีเอช เป็น 5.8 ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.4 โมลาร์ (พีเอช 3.8) กวน เป็นเวลา 30 นาที เหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 2,500xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตะกอนที่ได้คือ แฟรกชัน IV

4. แพรกชั้น IV-I เตรียมโดยการนำส่วนใสจากข้อ 1 เติมเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 18 ที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 5.2 ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.4 โมลาร์ (พีเอช 3.8) กวนเป็นเวลา 30 นาที เหยียงแยกที่ความเร็วรอบ 2,500xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตะกอนที่ได้คือ แพรกชั้น IV-I

5. แพรกชั้น I-S เตรียมโดยนำแพรกชั้น I มาละลายด้วยทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7) นำสารละลายที่ได้มาให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ทำให้เย็นที่ 0 องศาเซลเซียส เหยียงแยกที่ความเร็วรอบ 2,500xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่ได้คือ แพรกชั้น I-S

6. นำทุกแพรกชั้นมาทำแห้งแบบ freeze-dry และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ฉ. การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีของ Laemmli (1970)

อุปกรณ์

1. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมินิเจล

สารเคมี

1. Acrylamide/bisacrylamide เตรียมโดยละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ bisacrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือนหลังจากการเตรียม

2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8

3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8

4. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

5. Sample buffer (SDS reducing buffer)

น้ำกลั่น 3.8 มิลลิลิตร

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 1.0 มิลลิลิตร

กลีเซอรอล	0.8 มิลลิลิตร
10 % SDS	1.6 มิลลิลิตร
เบต้า-เมอแคปโตเอธานอล	0.4 มิลลิลิตร
1% โบรโมไฟโนลบลู	0.4 มิลลิลิตร

6. 5x electrod (running) buffer, pH 8.3

Tris base	9 กรัม
ไกลซีน	43.2 กรัม
SDS	3 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

7. Catalyst ประกอบด้วย

2 % Ammonium persulfate เตรียมก่อนที่จะใช้

TEMED (N,N,N', N'-tetramethyl ethylenedismine)

8. โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล High Molecular Weigth (Sigma)

ประกอบด้วย myosin, β -Galactosidase, phsphorylase b, fructose-6-phosphate kinase,

albumin, glutamic dehydrogenase, ovalbumin, glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase มีน้ำหนักโมเลกุล 250,000 116,000 67,000 84,000 66,000, 55,000

45,000 36,000 คาลตัน ตามลำดับ

9. สีย้อมโปรตีน Coomassie Billiant Blue R-250

Staining Solution : ละลาย Coomassie Billiant Blue R-250 0.04 กรัม ใน เมธานอล

100 มิลลิลิตร, คนจนละลายหมด (20 นาที) แล้วเติม Glacial

Acetic acid 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร

Destaining Solution 1 : ผสม เมธานอล 200 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 30 มิลลิลิตร และ

น้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร

Destaining Solution 2 : ผสม เมธานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 75 มิลลิลิตร และ

น้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่าง 3 กรัม ผสมกับ 5% SDS 27 มิลลิลิตร โฮโมจิไนส์ 1 นาที บ่มที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายมาเหวี่ยงแยก 10,000xg เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้มาผสมกับ Sample buffer (อัตราส่วน 1:1) ให้มีปริมาณ โปรตีน เท่ากับ 15 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร ต้มสารผสม เป็นเวลา 4 นาที

2. การเตรียม running gel

สารเคมี	12 % gel	10 % gel	5 % gel
30% Acrylamide/bis	1.4 ml	1.167 ml	0.583 ml
1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8	0.875 ml	0.875 ml	0.875 ml
1 % SDS	0.35 ml	0.35 ml	0.35 ml
น้ำกลั่น	0.525 ml	0.758 ml	1.34 ml
2 % Ammomium persufate	0.35 ml	0.35 ml	0.35 ml
TEME	5 ul	5 ul	5 ul

3. การเตรียม stacking gel

30% Acrylamide/bis	0.4 ml
0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8	1.0 ml
1 % SDS	0.3 ml
น้ำกลั่น	1.1 ml
0.1 M EDTA	0.8 ml
2 % Ammomium persufate	0.4 ml
TEMD	5 ul

4. การแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ประกอบชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นเติม electrod buffer ให้เต็ม chamber จากนั้น load ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส เข้ากับ power supply เปิดกระแสไฟฟ้า 50 volt จนสีของโบรโมฟินอลบลู เคลื่อนถึง

running gel (ประมาณ 20 นาที) เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 150 volt จนสีของโบรโมไฟโนลบลู เคลื่อนจนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้า

5. การย้อมสีโปรตีนในเจล โดยย้อมใน staining solution 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ด้วย Destaining solution 1 เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ใน Destaining solution 2

ภาคผนวก ข. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

โดยวิธี MDC-incorporating Activity Assay (Takagi *et al.*, 1986)

อุปกรณ์

1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
2. เครื่องฟลูออเรสเซนสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
3. นาฬิกาจับเวลา
4. Vortex mixer

สารเคมี

1. เอธิลีนไกลคอลโมโนเอธิลอีเทอร์เข้มข้นร้อยละ 20
2. แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์
3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7.5)
4. ไดมิลเลทเคซีน 0.1 โมลาร์ ในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7.5)
5. ไดไทโอทรีโอทอล (DTT) 0.2 โมลาร์
6. ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อมิลลิลิตร
7. โมโนแดนซิลแดนคาเวอริน 0.25 มิลลิโมลาร์
8. แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 โมลาร์

วิธีการ

1. ผสมตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร กับสารละลายเอธิลีนไกลคอลโมโนเอธิลอีเทอร์เข้มข้นร้อยละ 20 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

2. เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร สารละลาย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7.5) จำนวน 1.2 มิลลิลิตร ไดโททรีโอ ทอล (DTT) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ จำนวน 50 ไมโครลิตร ทรอมบิโน เข้มข้น 100 NIH ยูนิตต่อ มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร และโมโนแคนซิลคาร์ดาเวอรินเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ จำนวน 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. เติมสารละลายโคเมซิลเลทเคซีนเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 200 ไมโครลิตร บ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร

5. วัดค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น excitation และ emission เท่ากับ 350 และ 480 นาโนเมตร

กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส 1 ยูนิต หมายถึงความสามารถของ เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมประสานโมโนแคนซิลคาร์ดาเวอรินและเคซีน ได้เป็น $MDC_{(incorporated)}$ 1 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 1 นาที

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ มีค่าเท่ากับยูนิตของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน การคำนวณ

$$MDC_{(incorporated)} = \frac{\Delta I_f}{13.7 (I_o)} \times MDC_{(total)}$$

เมื่อ ΔI_f = ผลต่างของค่าการเรืองแสงที่เวลา 0 นาที และ 30 นาที

I_o = ค่าการเรืองแสงที่เวลา 0 นาที

$MDC_{(total)}$ = ความเข้มข้นของโมโนแคนซิลคาร์ดาเวอรินในชุดทดลอง

13.7 = enhancement factor

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{MDC_{(incorporated)}}{\text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาณตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

$$\frac{\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

ภาคผนวก ข. ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเกาะทะเลของเจลชวารีที่เติมพลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	1534218	383555	311.84**
Error	10	12300	1230	
Total	14	1546518		

CV = 5.3%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเกาะทะเลของเจลชวารีที่เติมพลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	19.02017	4.57704	3.71*
Error	10	12.82420	1.28242	
Total	14	31.84432		

CV = 7.5%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวารีที่เติม
พลาสติกหุ้มรอยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2
ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	1978638	395728	348.43**
Error	12	13629	1136	
Total	17	1992267		

CV = 3.4%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจล
ซูวารีที่เติมพลาสติกหุ้มรอยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิต่างๆ
เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	45.78374	11.44593	23.91**
Error	10	4.78615	0.47861	
Total	14	50.56988		

CV = 5.8%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติม
พลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเชื้อดัดที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2
ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	556.9848	139.2462	2234.4**
Error	10	0.6232	0.0623	
Total	14	556.6079		

CV = 0.4%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติม
พลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเชื้อดัดที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2
ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	6.86276	1.37255	14.64**
Error	12	1.12491	0.09374	
Total	17	7.98767		

CV = 0.4%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของ
เจลซูวารีที่เติมพลาสติกมวลร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัว ที่อุณหภูมิต่างๆ
เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.75818	0.18954	8.48**
Error	10	0.22354	0.02235	
Total	14	0.98172		

CV = 7.0%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของ
เจลซูวารีที่เติมพลาสติกมวลร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัว ที่อุณหภูมิต่างๆ
เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	0.97710	0.19542	4.36*
Error	12	0.53800	0.04483	
Total	17	0.98172		

CV = 11.1%

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวารีที่เติม
พลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
เป็นเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	292263	97421.3	415.67**
Error	8	1875	234.4	
Total	11	294138		

CV = 2.7%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจล
ซูวารีที่เติมพลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35
องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	3.68022	1.22674	3.32 ^{ns}
Error	8	2.95577	0.36947	
Total	11	6.63599		

CV = 4.2%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลชิวาริที่เติม
พลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	2199298	549825	264.74**
Error	10	20769	2077	
Total	14	2220067		

CV = 4.1%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจล
ชิวาริที่เติมพลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35
องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	44.33724	11.08431	40.75**
Error	10	2.72.22	0.27202	
Total	14	47.05746		

CV = 3.8%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลชงวาริที่เต็ม
 พลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเชื้อตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
 เป็นเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	2.42448	0.80816	8.68*
Error	7	0.65195	0.09314	
Total	10	3.07642		

CV = 0.6%

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลชงวาริที่เต็ม
 พลาสมาเลือดหมูร้อยละ 0.5 และเชื้อตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
 เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	2.83770	0.70943	6.25**
Error	10	1.13438	0.11344	
Total	14	3.97208		

CV = 0.5%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัด
ของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมาเลียดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ
35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.25201	0.88400	2.85 ^{ns}
Error	8	0.23577	0.02947	
Total	11	0.48770		

CV = 10.1%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัด
ของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมาเลียดหมูร้อยละ 0.5 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ
35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.01317	0.00329	0.095 ^{ns}
Error	10	0.34465	0.03447	
Total	14	0.35782		

CV = 9.1%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเกาะทะเลของเจดชวาริที่เติม
พลาสติกหุ้มที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	176839.11	44209.77	231.65**
Error	10	1908.43	190.84	
Total	14	178747.54		

CV = 2.6%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเกาะทะเลของเจด
ชวาริที่เติมพลาสติกหุ้มที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ
35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	4.06859	1.01715	0.94 ^{ns}
Error	10	10.82404	1.08240	
Total	14	14.89263		

CV = 7.4%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเกาะทะเลของเจลชวาริที่เติม
 พลาสมาเลือดหมูที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35
 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	595461.9	148865.5	16.2**
Error	10	91903.1	9190.3	
Total	14	687365.0		

CV = 8.4%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเกาะทะเลของเจล
 ชวาริที่เติมพลาสมาเลือดหมูที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ
 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	13.81480	3.45370	3.88*
Error	10	8.89766	0.88977	
Total	14	22.71246		

CV = 0.7%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติม
พลาสมาเลือดหมูที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	63.34100	15.83525	66.64**
Error	10	2.37625	0.23763	
Total	14	65.71725		

CV = 0.8%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติม
พลาสมาเลือดหมูที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	37.35368	9.33842	104.55**
Error	10	0.89321	0.08932	
Total	14	38.34699		

CV = 0.4%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 23 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัด
ของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมาเลียดหมูที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่
อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.73639	0.18410	4.05**
Error	10	0.45494	0.04549	
Total	14	1.19133		

CV = 17.4%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 24 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัด
ของเจลซูวารีที่เติมพลาสติกมาเลียดหมูที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่
อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.20290	0.05072	1.29 ^{ns}
Error	10	0.39238	0.03924	
Total	14	0.39328		

CV = 15.9%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 25 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชันต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.06145	0.01536	1140.85**
Error	10	0.00014	0.00001	
Total	14	0.06159		

CV = 3.5%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 26 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	0.02447	0.00489	326.25**
Error	12	0.00018	0.00002	
Total	17	0.02465		

CV = 4.9%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 27 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I-S

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	0.13617	0.02723	823.88**
Error	12	0.00040	0.00003	
Total	17	0.13657		

CV = 2.2%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของแคลเซียมกลอไรด์ต่อ
กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	17323.33	5774.44	50.69**
Error	8	911.33	113.92	
Total	11	18234.67		

CV = 5.1%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 29 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของแคลเซียมกลอไรด์ต่อ
กิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I-S

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	68182.92	23060.97	24.60**
Error	8	7498.00	937.25	
Total	11	76680.92		

CV = 3.3%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 30 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของ
เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	11935.33	3978.44	119.35**
Error	8	266.67	33.33	
Total	11	12202.00		

CV = 4.9%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 31 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของ
เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสของแฟรกชัน I-S

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	71126.92	23708.97	218.52**
Error	8	868.00	108.50	
Total	11	71994.92		

CV = 2.2%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 32 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลโมโคริที่เติม
แฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	179674.24	59891.41	82.68**
Error	8	5794.73	724.34	
Total	11	185468.98		

CV = 6.7 %

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 33 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะเลของเจล
โมโครีที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ
60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	9.30938	3.10312	74.72**
Error	8	0.33225	0.041531	
Total	11	9.64163		

CV = 1.5%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 34 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแรงเจาะทะเลของเจล โมโครีที่เติม
แฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	229335.78	76445.26	268.51**
Error	8	2277.60	284.70	
Total	11	231613.39		

CV = 3.8%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 35 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทาวก่อนเจาะทะลุของเจล
โมโครีที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ
60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	9.14595	3.04865	27.05**
Error	8	0.90155	0.11269	
Total	11	10.04750		

CV = 2.4%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 36 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความขาวของเจลโมโครีที่เติม
แฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	1.01776	0.33925	4.45*
Error	8	0.61036	0.07629	
Total	11	1.62813		

CV = 0.4%

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 37 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจล โมโครีที่เติม
แฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.66795	0.22265	0.479 ^{ns}
Error	8	0.71763	0.46470	
Total	11	4.38559		

CV = 0.4%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 38 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัด
ของเจล โมโครีที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่
อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.563566	0.187855	12.24**
Error	8	0.122733	0.015341	
Total	11	0.686299		

CV = 6.2%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 39 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลโมโคโรที่เติมแฟรกชัน IV-I ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.514166	0.171388	17.24**
Error	8	0.079533	0.009941	
Total	11	0.593699		

CV = 4.9%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 40 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลซูวาริที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรมอนบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	36325.313	9081.328	26.45**
Error	10	3433.186	343.318	
Total	14	39758.499		

CV = 4.0 %

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 41 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจล
 ชูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียม
 คลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน
 และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	12.5639	3.1409	14.58**
Error	10	2.1545	0.2154	
Total	14	14.7184		

CV = 3.3%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 42 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะลุของเจลชูวารีที่เติม
 แฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์
 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัว
 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความ
 ร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	193487.44	48371.86	5.20**
Error	10	93074.99	9307.49	
Total	14	286562.44		

CV = 10.7 %

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 43 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจล
ซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียม
คลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน
และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการ
ให้ความ ร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	7.95911	1.98977	19.67**
Error	10	1.01171	0.10117	
Total	14	8.97083		

CV = 2.3%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 44 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติม
แฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100
มิลลิโมลาร์ ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัว
ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	7.6996	1.9249	5.71**
Error	10	3.3714	0.3371	
Total	14	11.0710		

CV = 0.8%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 45 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวาริที่เติม
 แพรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100
 มิลลิโมลาร์ ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัม แพรกชัน และเซ็ดตัว
 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความ
 ร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	1.5073	0.3768	1.47 ^{ns}
Error	10	2.5652	0.2565	
Total	14	4.0726		

CV = 0.6%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 46 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัด
 ของเจลซูวาริที่เติมแพรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มี
 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัม
 แพรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.1154	0.0288	3.79*
Error	10	0.0761	0.0076	
Total	14	0.1915		

CV = 4.2%

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 47 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวารีที่เติมแฟรกชัน I-S ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	0.02257	0.00564	0.63 ^{ns}
Error	10	0.08920	0.00892	
Total	14	0.11177		

CV = 4.2%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 48 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเกาะทะลุของเจลซูวารีที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	117501.1	39167.0	11.88**
Error	8	26393.2	3296.7	
Total	11	143874.3		

CV = 8.9%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 49 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะเลของเจลชิวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	9.34136	3.11379	19.67**
Error	8	1.26647	0.15831	
Total	11	10.60783		

CV = 2.8%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 50 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะเลของเจลชิวาริที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	220709.41	73569.80	63.24**
Error	8	9307.26	1163.40	
Total	11	230016.67		

CV = 3.3%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 51 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจล
ซูวารีที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มี
แฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน
และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการ
ให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	1.8955	0.6318	17.09**
Error	8	0.2957	0.0369	
Total	11	1.1913		

CV = 1.3%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 52 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติม
แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มี แฟรกชัน I-S
ร้อยละ 0.2 ทรอมบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัว
ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.20032	0.06677	0.24 ^{ns}
Error	8	2.23176	0.27897	
Total	11	2.43208		

CV = 0.8%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 53 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติม
แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S
ร้อยละ 0.2 ทอมนบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน และเซ็ดตัวที่
อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	2.40755	0.80251	3.67 ^{ns}
Error	8	1.75142	0.21892	
Total	11	143874.3		

CV = 0.6%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 54 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัด
ของเจลซูวารีที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่
มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทอมนบิน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชัน
และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.03656	0.01219	1.55 ^{ns}
Error	8	0.06273	0.00784	
Total	11	230016.67		

CV = 4.2%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 55 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัดของเจลซูวารีที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 ทรอมบีน 100 NIH ยูนิตต่อกรัมแฟรกชันและเซ็ดตัว ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.03307	0.01102	1.86 ^{ns}
Error	8	0.04740	0.00593	
Total	11	0.08047		

CV = 3.6%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 56 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเกาะทะเลของเจลซูวารีที่เติมทรอมบีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัว ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	39882.69	13294.23	43.88**
Error	8	2423.57	302.95	
Total	11	42306.26		

CV = 3.8%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 57 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะเลของเจลดชวาริที่เดิมทรมอบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	11.18278	3.72759	14.35**
Error	8	2.07806	0.25976	
Total	11	42306.26		

CV = 3.6%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 58 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแรงเจาะทะเลของเจลดชวาริที่เดิมทรมอบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	178540.3	59513.4	14.88**
Error	8	32001.2	4000.2	
Total	11	210541.5		

CV = 6.8%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 59 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะทางก่อนเจาะทะเลของเจล
 ชูวารีที่เติมทรอมบิโนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S
 ร้อยละ 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35
 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	9.37878	3.12625	50.28**
Error	8	0.49743	0.06218	
Total	11	9.87620		

CV = 1.8%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 60 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลชูวารีที่เติม
 ทรอมบิโนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ
 0.2 แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35
 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	3.88362	1.29454	4.36*
Error	8	2.37655	0.29707	
Total	11	9.87620		

CV = 0.8%

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 61 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวของเจลซูวารีที่เติม
 ทรมอนบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน I-S ร้อยละ
 0.2 แกลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 35
 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.94605	0.31535	1.58 ^{ns}
Error	8	1.59193	0.19899	
Total	11	2.53798		

CV = 0.6%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 62 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัด
 ของเจลซูวารีที่เติมทรมอนบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟรกชัน
 I-S ร้อยละ 0.2 แกลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่
 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.06156	0.02052	2.90 ^{ns}
Error	8	0.05653	0.00707	
Total	11	0.11809		

CV = 4.1%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 63 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณของเหลวจากการบีบอัด
ของเจลซูวารีที่เติมทรอมบินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่มีแฟร็ก
ชัน I-S ร้อยละ 0.2 แกลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเซ็ดตัวที่
อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งผ่านการให้ความร้อน

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	3	0.02083	0.00694	1.60 ^{ns}
Error	8	0.03467	0.00433	
Total	11	0.05550		

CV = 3.1%

ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวจันทิรา ศรีวิสัย

วัน เดือน ปีเกิด 30 ธันวาคม 2517

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีการอาหาร	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คณะเกษตรศาสตร์ นครศรีฯ	2540