บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ขนาด 60 ตัวต่อกิโลกรัม ซื้อมาจากฟาร์มภายในเขตภาคใต้ โดยมีระยะเวลาตั้งแต่จับจนถึงโรงงานอุตสาหกรรม 24-36 ชม. และเก็บรักษาในกล่องโฟม ซึ่งมีอัตราส่วนกุ้งต่อน้ำแข็งเท่ากับ 1:3 ในระหว่างการขนส่งมายังห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตรภายใน 1 ชม.

2.ไส้เทียมสำหรับบรรจุซูริมิ (Surimi casing) ชนิดพอลิไวนิลลิดีน (polyvinylidine) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร

3.ถุงพลาสติกไนลอนประกบกับพอลิเอทิลีน หนา 85 ไมโครเมตร

4.สารตัวกลางให้ความดัน ได้แก่ Caster oil ร้อยละ 20 ผสมกับ เอธานอล ร้อยละ 80

5.โปรตีนพลาสมาเลือดวัว จากบริษัทฟูด อี คิว จำกัด ประเทศไทย

6.เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ จากบริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ จำกัด (ประเทศไทย) ชนิด TG-K ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสร้อยละ 0.6 โปรตีนถั่วเหลืองร้อยละ 33.3 โซเดียมฟอสเฟตร้อยละ 60 และอื่นๆ ร้อยละ 6.1

7. สารเคมีเกรดวิเคราะห์(Analytical grade) สำหรับวิเคราะห์ทางเคมี และสกัดโปรตีนกล้ามเนื้อ

อุปกรณ์

1. เครื่องกำเนิดความดันสูง ยี่ห้อ Standed Fluid Power รุ่น S-FL-850-9-W ประเทศอังกฤษ

2. เครื่องปิดผนึกความร้อน ยี่ห้อ WINNER PACKING ประเทศไทย

3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง ยี่ห้อ Sciencetific รุ่น Denver 15 ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ ยี่ห้อ Ultra turrax รุ่น T25B ประเทศมาเลเซีย

5. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส ยี่ห้อ Texture Analyzer รุ่น TA-XT2i ประเทศอังกฤษ

6. เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น ColorFlex ประเทศสหรัฐอเมริกา

7. เครื่อง Differential scanning calorimeter ยี่ห้อ PERKIN ELMER รุ่น DSC7 ประเทศสหรัฐอเมริกา

8. เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC-5B plus ประเทศสหรัฐอเมริกา

9. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-16001 ประเทศออสเตรเรีย

10. กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-2010 ประเทศญี่ปุ่น

11. กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800LV ประเทศญี่ปุ่น

12. ชุดอิเล็กโตรโฟริซิส ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น Mini-Protein Π ประเทศสหรัฐอเมริกา

13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ W 350 รุ่น Memmert ประเทศสหรัฐอเมริกา

14. เครื่องสับผสม ยี่ห้อ MOULINEX รุ่น MASTERCHEF ประเทศฝรั่งเศส

15. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น AB 204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

16. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และสกัดโปรตีนกล้ามเนื้อ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมวัตถุดิบ

นำกุ้งกุลาดำมาล้างทำความสะอาด ตัดหัว และปอกเปลือกแล้วบรรจุในถุงพลาสติกพอลิเอทิลีนแล้วเก็บรักษาในน้ำแข็งควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 0-2 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาการเตรียมตัวอย่าง

2. การศึกษาผลของกระบวนการใช้ความดันสูง ความร้อน และการใช้ความดันสูงร่วมกับความร้อนต่อการเกิดเจลของเนื้อกุ้งกุลาดำบด

2.1 ผลของกระบวนการใช้ความดันสูง ความร้อน และการใช้ความดันสูงร่วมกับความร้อนต่อการเกิดเจลของเนื้อกุ้งกุลาดำบด

เตรียมเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบด (ดัดแปลงจาก Nagashima *et al*., 1993) โดยนำเนื้อกุ้งกุลาดำมาบดผสมกับเกลือร้อยละ 2.5 นาน 4 นาที ด้วยเครื่องสับผสม โดยควบคุมอุณหภูมิระหว่างการสับผสมไม่ให้เกิน 4 องศาเซลเซียส โดยการลดอุณหภูมิของโถปั่นผสมและใบมีด ด้วยการแช่ด้วยน้ำแข็งก่อนใช้งาน แล้วบรรจุในไส้เทียมซูริมิที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร แล้วมัดเป็นท่อนยาว 15 เซนติเมตร และบรรจุลงในถุงไนลอนประกบกับพอลิเอทิลีนแล้วปิดผนึก หลังจากนั้นแบ่งชุดการทดลองดังนี้

-ชุดการทดลองที่ 1 มีการให้ความดันที่ระดับ 400 600 และ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-29 องศาเซลเซียส) ด้วยเครื่องกำเนิดความดันสูง และสารที่ใช้เป็นตัวกลางในการให้ความดันประกอบด้วย เอธานอลร้อยละ 80 และ castor oil ร้อยละ 20

-ชุดการทดลองที่ 2 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

-ชุดการทดลองที่ 3 ให้ความดันที่ระดับ 200, 400, 600 และ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-29 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

หลังจากผ่านกระบวนการตามชุดการทดลองที่ 1-3 แล้วนำมาทำให้เย็นโดยใช้น้ำผสมน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่าง โดยมีการตรวจสอบดังนี้

2.1.1 ค่าสี ด้วยระบบ CIE Lab โดยใช้เครื่องวัดค่าสี ดังแสดงในภาคผนวก ข1

2.1.2 ค่าการสูญเสียน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ โดยการชั่งน้ำหนักภายหลังการแปรรูปเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นก่อนการแปรรูป ดังแสดงในภาคผนวก ข4

2.1.3 ค่าเนื้อสัมผัสด้วยวิธี Texture Profile Analysis (TPA) โดยใช้เครื่อง Texture Analyzer (Bourne, 1978) ดังแสดงในภาคผนวก ข2 และวัดค่าแรงเจาะทะลุ (Breaking Force) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (Breaking Deformation) (ดัดแปลงจาก Lanier, 1992) ดังแสดงในภาคผนวก ข3

2.2 ผลของการใช้ความดันสูง ความร้อน และความดันสูงร่วมกับความร้อนที่มีผลต่อโปรตีนแอกโตไมโอซินธรรมชาติ

โดยสกัดโปรตีนแอกโตไมโอซินธรรมชาติ (Nautural Actomyosin, NAM) ตามวิธีของ Benjakul และคณะ (1997) ดังแสดงในภาคผนวก ก และนำแอกโตไมโอซินธรรมชาติละลายอยู่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อกรัม แล้วแบ่งชุดการทดลอง ดังนี้

-ชุดการทดลองที่ 1 ให้ความดันที่ 0.1, 100, 200, 400, 600, 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-29 องศาเซลเซียส)

-ชุดการทดลองที่ 2 ให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียว โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

-ชุดการทดลองที่ 3 ให้ความดันร่วมกับให้ความร้อน โดยให้ความดันที่ 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-29 องศาเซลเซียส) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

หลังจากนั้นนำตัวอย่างสารละลายแอกโตไมโอซินธรรมชาติที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจสอบคุณภาพดังนี้

2.2.1 ตรวจสอบความขุ่น ตามวิธีของ Benjakul และคณะ (2001) ดังแสดงในภาคผนวก ค1

2.2.2 ตรวจสอบปริมาณไฮโดรโฟบิกบนพื้นผิว โดยวิธี ANS ตามวิธีของ Benjakul และคณะ (1997) ดังแสดงในภาคผนวก ค2

2.2.3 ตรวจสอบปริมาณซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด โดยวิธี DTNB ตามวิธีของ Benjakul และคณะ (2001) ดังแสดงในภาคผนวก ค3

2.2.4 ตรวจสอบการปริมาณพันธะไดซัลไฟด์ ตามวิธีของ Benjakul และคณะ (2001) ดังแสดงในภาคผนวก ค4

และนำตัวอย่างสารละลายแอกโตไมโอซินตามธรรมชาติที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกรัม มาตรวจสอบคุณภาพดังนี้

2.2.5 ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนไมโอไฟบริล โดยใช้วิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ดังแสดงในภาคผนวก ง

2.2.6 ตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคโดยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ตามวิธีของ Nip และ Moy (1988) ดังแสดงในภาคผนวก จ

2.2.7 ตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคโดยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) โดยดัดแปลงตามวิธีของ Ngapo และคณะ (1996) ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

3. การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของโปรตีนพลาสมาเลือดวัวต่อคุณลักษณะเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบด

เตรียมเจลเนื้อกุ้งบดที่มีระดับความเข้มข้นของโปรตีนพลาสมาเลือดวัว ดังนี้ ร้อยละ 0, 1.0, 2.0 และ 3.0 และมีการให้ความดันกับเนื้อกุ้งกุลาดำบดตามสภาวะที่ให้ค่าความแข็งแรงของเจลสูงสุดจากการทดลองในข้อ 2.1

หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพดังนี้

3.1 ตรวจสอบการสูญเสียน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ โดยการชั่งน้ำหนักภายหลังการแปรรูปเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นก่อนการแปรรูป ดังแสดงในภาคผนวก ข4

3.2 ตรวจสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ ตามวิธีของ Jatuphong และคณะ (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ข5

3.3 ตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนไมโอไฟบริล โดยใช้วิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ดังแสดงในภาคผนวก ง

3.4 วัดค่าแรงเจาะทะลุ (Breaking Force) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (Breaking Deformation) (ดัดแปลงจาก Lanier, 1992) ดังแสดงในภาคผนวก ข3

3.5 ตรวจสอบค่าสี ด้วยระบบ CIE Lab โดยใช้เครื่องวัดค่าสี ดังแสดงในภาคผนวก ข1

3.6 ตรวจสอบ TCA-Soluble Peptide ตามวิธีของ Morrissey และคณะ (1993) ดังแสดงในภาคผนวก ค5

4. การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ต่อคุณลักษณะการเกิดเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบด

เตรียมเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบดตามข้อ 2.1 และเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 และแบ่งชุดการทดลอง ดังนี้

-ชุดการทดลองที่ 1 ให้ความดันที่ 200 400 และ 600 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-29 องศาเซลเซียส)

-ชุดการทดลองที่ 2 ให้ความดันที่ 200 400 และ 600 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-29 องศาเซลเซียส) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

-ชุดการทดลองที่ 3 ให้ความดันที่ 200 400 และ 600 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-29 องศาเซลเซียส) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และให้ความร้อนอีกที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

-ชุดการทดลองที่ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

-ชุดการทดลองที่ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และให้ความร้อนอีกที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพของเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบดตามข้อ 3.1- 3.4

5. การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสต่อคุณลักษณะการเกิดเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบด

เตรียมเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบดตามข้อ 2.1 และเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 แล้วให้ความดันตามสภาวะที่ให้ค่าความแข็งแรงของเจลสูงสุดจากการทดลองในข้อ 3 หลังจากนั้นนำเจลที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพเช่นเดียวกับข้อ 4

คัดเลือกสภาวะที่ทำให้ค่าความแข็งแรงของเจลสูงสุดจากข้อ 3, 5 และตัวอย่างที่ไม่เติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์และโปรตีนพลาสมาเลือดวัว มาตรวจสอบคุณภาพโครงสร้างทางจุลภาคโดยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ตามวิธีของ Nip และ Moy (1988) ดังแสดงในภาคผนวก จ

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ในการทดลองข้อ 2-5 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window Version 10.0 (Chicago, IL)