บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

ปลาทับทิม น้ำหนักตัวโดยเฉลี่ย 700-800 กรัม ซื้อจากตลาดขายปลาสดสะพานปลา กรุงเทพฯ บรรจุในกล่องโฟมโดยเก็บรักษาในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 ± 2 °C และขนส่งมายังห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมี

3.2.1 การผลิตซูริมิ

- Sodium chloride (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Sodium tripolyphosphate (STPP)
  (APS Ajax Finechem, New South Wales, Australia) (Food grade)
- D-sorbital ($CH_2OH(CHOH)_4CH_2OH$)
  (APS Ajax Finechem, New South Wales, Australia) (Food grade)
- น้ำตาลทราย (บริษัทมิตรผล จำกัด, จ.ขอนแก่น)

3.2.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และกายภาพ

- Boric acid (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Bromocresol green (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R. grade)
- Citric acid (Fluka, Steinheim, Switzerland) (A.R. grade)
- Di-sodium hydrogen orthophosphate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)
  (APS Ajax Finechem, New South Wales, Australia) (A.R. grade)
- Formaldehyde solution, 37 % (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Hydrochloric acid, 37 % (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Methyl red (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R. grade)
- Petroleum ether (bp. 40-60 °C) (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Potassium carbonate anhydrous (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Selenium reagent mixture (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R. grade)
- Sodium dihydrogen orthophosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)
  (APS Ajax Finechem, New South Wales, Australia) (A.R. grade)

- Sodium hydroxide anhydrous (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Sulfuric acid, 96 % (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Trichloroacetic acid (TCA) (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R. grade)

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Modified Lowry's method

- Bovine serum albumin (BSA) (Fluka, Steinheim, Switzerland) (A.R. grade)
- Copper sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$)
  (APS Ajax Finechem, New South Wales, Australia) (A.R. grade)
- Folin-Ciocalteu phenol reagent (Fluka, Steinheim, Switzerland) (A.R. grade)
- Potassium sodium tartrate
  (APS Ajax Finechem, New South Wales, Australia) (A.R. grade)
- Sodium carbonate
  (APS Ajax Finechem, New South Wales, Australia) (A.R. grade)
- Sodium deoxycholate (DOC) (Fluka, Steinheim, Switzerland) (A.R. grade)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
  (APS Ajax Finechem, New South Wales, Australia) (A.R. grade)
- Sodium hydroxide anhydrous (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grage)
- Trichloroacetic acid (TCA) (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R. grade)

3.2.4 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลโปรตีนโดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

- Acrylamide solution (40 % (w/v) acrylamide)
  (Amersham Phamacia Biotech, Uppsala, Sweden) (A.R. grade)
- Ammonium persulfate (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Bromophenol blue (Merck, Darmstadt, Germany) (A.R. grade)
- Coomassie Blue R-250 (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Glacial acetic acid (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Glycerol (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Glycine (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Hydrochloric acid (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- 2-mercaptoethanol (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Methyl alcohol (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)

- Standard protein marker ; MW. 6.5-205 kDa (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
  (APS Ajax Finechem, New South Wales, Australia) (A.R. grade)
- TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylene-ethylenediamine)
  (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)
- Tris (2-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
  (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) (A.R. grade)

3.3 อุปกรณ์การทดลอง

3.3.1 การผลิตซูริมิ

- เครื่องบดเนื้อ และผสมอาหาร (Kenwood, A907, Long Beach, California, USA)
- เครื่องบีบอัดไฮดรอลิก (hydraulic press) (บริษัทกิตติวัฒนา จำกัด, กรุงเทพฯ)
- ถุงพลาสติกชนิด LDPE ยี่ห้อ Ziploc ขนาด 26.8 cm x 27.9 cm (บริษัทไทยกริ๊ฟเทค จำกัด, กรุงเทพฯ)
- เครื่องทำความเย็นไนโตรเจนเหลว (cryogenic freezer) (บริษัทบางกอกอินดัสเทรียลแก๊ส จำกัด, กรุงเทพฯ)
- ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 °C (Sanyo, SF-C95, Osaka, Japan)
- เครื่องสับผสม (food processor) (MARA, model 2102240, Taipe, Taiwan)
- หลอดสแตนเลสทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm สูง 3 cm
- แผ่นยาง และแผ่นสแตนเลสขนาด 3 cm x 3 cm
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Heto Lab Equipment, DT-1, Allerød, Denmark)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (TECHNE, TE-10D Tempunit, Cambridge, UK)
- เครื่องวัดความชื้น (Sartorius, MA30, Göttingen, Germany)

3.3.2 การวิเคราะห์ทางเคมี และกายภาพ

- เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP210S, Göttingen, Germany)
- เครื่องชั่ง ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, BP310S, Göttingen, Germany)
- ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (BÜCHI, B-324, Flawil, Switzerland)
- เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Soxlet Apparatus) (Gerhardt, EV-16, Königswinter, Germany)
- ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100-110 °C (hot air oven) (Memmert, model 600, Oxford, Connecticut, USA)
- pH meter (HORIBA, F-21, Kyoto, Japan)

- เครื่องบดอาหาร (Waring Commercial Blender, 32BL80, New Hartford, Connecticut, USA)
- โถดูดความชื้น (desiccator)
- Conway jar microunit (Standard type, Sibata, Japan)

3.3.3 การวิเคราะห์คุณภาพเจลซูริมิ

- เครื่องวัดสี (Minolta, CR300 series, Tokyo, Japan)
- เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyzer) (Stable Micro System, TA-XT2, Surrey, UK) ใช้หัววัดสแตนเลส P0.25S (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 mm)

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Modified Lowry's method

- เครื่องเหวี่ยงแยก (Thermo IEC, multi-RF, Miami, Florida, USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Shimadzu, UV-240, Kyoto, Japan)

3.3.5 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

- ชุดวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลโปรตีนโดยวิธี gel electrophoresis (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) ซึ่งประกอบด้วย ชุด minigel electrophoresis (Heofer, mini VE) และ power supply (EPS 301)
- Eppendorf tube
- Hamilton Syringe ขนาด 25 µl
- Micro pipette ขนาด 1-5 ml, 100-1000 µl, 100-200 µl และ 2-20 µl

3.4 ขั้นตอน และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเตรียมวัตถุดิบ และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

สุ่มตัวอย่างปลาทับทิมนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วแล่เอากล้ามเนื้อขาวจากบริเวณกล้ามเนื้อส่วนหลัง โดยหลีกเลี่ยงเนื้อบริเวณส่วนท้อง ตัดแยกส่วนเนื้อแดงออก นำกล้ามเนื้อขาวที่ได้มาหั่นเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2 cm และบดด้วยเครื่องบดเนื้อ Kenwood จากนั้นนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และความสดของปลา

3.4.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธี A.O.A.C (1995) รายละเอียดในภาคผนวก ก.1-ก.4

3.4.1.2 วิเคราะห์ความสดของปลาโดยวัดปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile bases, TVB) และปริมาณไตรเมทธิลลามีน (trimethylamine, TMA) ตามวิธีของ Ng (1987) รายละเอียดในภาคผนวก ก.5-ก.6

3.4.2 การเตรียมเจลซูริมิ

3.4.2.1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อปลาบด

นำตัวอย่างปลาสดที่เก็บในน้ำแข็งมาล้างทำความสะอาด ตัดหัว ควักไส้ แล่เนื้อปลาเฉพาะบริเวณที่เป็นเนื้อขาว นำเนื้อปลาที่ได้ไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ Kenwood จากนั้นนำเนื้อปลาบดไปล้างด้วยน้ำผสมน้ำแข็งควบคุมอุณหภูมิน้ำให้ต่ำกว่า 10 ℃ 3 ครั้ง ในอัตราส่วนของเนื้อปลาบด : น้ำผสมน้ำแข็ง 1:4 โดยน้ำหนัก ในการล้างแต่ละครั้งใช้เวลา 10 นาที โดย 5 นาทีแรกคนด้วยไม้พายสม่ำเสมอ แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที กรองเอาน้ำออกด้วยผ้าขาวบาง ล้างน้ำครั้งสุดท้ายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 % (w/w) เมื่อล้างน้ำครั้งสุดท้ายแล้วบีบน้ำออกด้วยเครื่องบีบ hydraulic press จากนั้นผสมเนื้อปลาบดกับน้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล และ โซเดียม-ไตรโพลีฟอสเฟต ปริมาณ 4, 4 และ 0.3 % ของน้ำหนักเนื้อปลา ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร Kenwood เป็นเวลา 5 นาที บรรจุเนื้อปลาบดที่ผสมแล้วในถุงพลาสติกชนิด LDPE นำไปแช่แข็งอย่างรวดเร็วโดยใช้ไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20±2 ℃ เพื่อรอทำการทดลองต่อไป

3.4.2.2 ขั้นตอนการเตรียมเจลซูริมิ

นำซูริมิแช่เยือกแข็งมาละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 ℃) เป็นเวลา 30 นาที จนตัวอย่างซูริมิมีอุณหภูมิประมาณ 0-4 ℃ สุ่มตัวอย่างซูริมิไปวัดปริมาณความชื้นโดยใช้เครื่อง moisture analyzer (Sartorious, MA-30) หั่นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ บดผสมซูริมิให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่องสับผสม ปรับปริมาณความชื้นของซูริมิให้เป็น 78 % โดยใช้น้ำแข็ง หลังจากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ 2.5 % (w/w) ของน้ำหนักซูริมิ สับผสมต่ออีก 2 นาที จนได้ซูริมิเพสท์ (surimi paste) ที่เป็นเนื้อเดียวกัน โดยควบคุมอุณหภูมิระหว่างบดผสมให้ต่ำกว่า 10 ℃ อัดซูริมิเพสท์ที่ได้ลงในหลอดสแตนเลสขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm สูง 3 cm ปิดปลายหลอดสแตนเลสทั้ง 2 ด้านด้วยแผ่นยาง และแผ่นสแตนเลส รัดด้วยหนังยางให้แน่น แล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ ระหว่างรอการทดลองแช่หลอดที่บรรจุซูริมิเพสท์เรียบร้อยแล้วในภาชนะบรรจุน้ำผสมน้ำแข็ง

3.4.3 การศึกษาภาวะการให้ความร้อนที่เหมาะสมกับการเกิดเจลของซูริมิจากปลาทับทิม

นำซูริมิเพสท์ที่บรรจุในหลอดสแตนเลสแล้วมาให้ความร้อนด้วยอุณหภูมิ 2 ระดับ (two-step heating) โดยนำซูริมิไปเตรียมเจลที่อุณหภูมิต่ำ (1st step heating) ศึกษาผลของอุณหภูมิ และ

ระยะเวลาในการให้ความร้อน โดยแปรอุณหภูมิ 7 ระดับ คือ 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 ℃ และระยะเวลาในการให้ความร้อน 4 ระดับ คือ 30, 60, 90 และ 120 นาที นำเจลซูริมิที่ได้ไปต้มให้สุกที่อุณหภูมิ 90 ℃ (2^{nd} step heating) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำเจลให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำเจลซูริมิออกจากหลอดสแตนเลสบรรจุในถุงพลาสติกชนิด LDPE เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ℃ ทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง นำไปทดสอบตามข้อ 3.4.7

วิเคราะห์ และประเมินผลเพื่อคัดเลือกภาวะในการเตรียมเจลที่ให้ค่าความแข็งแรง (gel strength) และค่าความขาว (whiteness) ที่สูง วางแผนการทดลองแบบ asymetric factorial design ขนาด 7 x 4 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SAS (version 6.12, SAS Institute Inc., North Carolina, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)

3.4.4 การศึกษาผลของเอนไซม์โปรติเอสต่อ myosin heavy chain ของโปรตีนปลาทับทิม

นำตัวอย่างซูริมิแช่เยือกแข็งที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2.1 มาสกัด crude actomyosin ตามวิธีของ MacDonald และ Lanier (1994) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.7 และสกัด crude protease จากเนื้อปลาทับทิมตามวิธีของ Boye และ Lanier (1988) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.8 นำเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีของ An และคณะ (1994a) รายละเอียดในภาคผนวก ก.9

เตรียมสารละลาย crude actomyosin ผสมกับ crude protease และ สารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) อย่างละ 0.5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ให้ค่าความแข็งแรงเจลสูงสุด และต่ำสุด จากข้อที่ 3.4.3 โดยบ่มเป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ myosin heavy chain โดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) รายละเอียดในภาคผนวก ก.11

3.4.5 การศึกษาผลของความสดของปลาต่อคุณภาพของเจลซูริมิ

นำตัวอย่างปลาทับทิมสดเก็บรักษาในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 ± 2 ℃ โดยบรรจุพร้อมน้ำแข็งในถังพลาสติกหุ้มฉนวนกันความร้อนที่มีช่องระบายน้ำด้านล่างในอัตราส่วนของปลา : น้ำแข็ง เท่ากับ 1 : 1 โดยน้ำหนัก ขณะที่เก็บรักษาปลาสดที่อุณหภูมิดังกล่าว นำตัวอย่างปลาสดไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และความสดตามวิธีในข้อ 3.1 ก่อนนำไปผลิตเป็นซูริมิ สุ่มตัวอย่างปลาทับทิมที่เวลาเก็บรักษาปลาสด 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน มาผลิตเป็นซูริมิ จากนั้นนำซูริมิมาเตรียมเจลโดยใช้ภาวะที่ให้เจลที่มีค่าความแข็งแรงสูงสุดจากข้อที่ 3.4.3 แล้ววิเคราะห์คุณภาพของเจลตามวิธีในข้อ 3.4.7

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SAS (version 6.12, SAS Institute Inc., North Carolina, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)

3.4.6 การศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาซูริมิในภาวะแช่แข็งต่อคุณภาพของเจลซูริมิ

นำซูริมิที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2.1 (ปลาทับทิมสดที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 ± 2 °C เป็นเวลา 0 วัน) บรรจุในถุงพลาสติกชนิด LDPE ขนาดบรรจุถุงละ 1.0 kg นำไปแช่แข็งด้วยเครื่องทำความเย็นไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20±2 °C เป็นเวลา 9 เดือน โดยทุก ๆ เดือน สุ่มตัวอย่างซูริมิมาเตรียมเจลโดยใช้ภาวะที่ให้เจลที่มีค่าความแข็งแรงสูงสุดจากข้อที่ 3.4.3 วิเคราะห์คุณภาพของเจลตามวิธีในข้อ 3.4.7 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายเกลือ (salt extractable protein, SEP) ตามวิธีของ Sultanbawa และ Li-Chan (1998) รายละเอียดในภาคผนวก ก. 12

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SAS (version 6.12, SAS Institute Inc., North Carolina, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)

3.4.7 การวิเคราะห์คุณภาพของเจลซูริมิ

3.4.7.1 วัดค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength) ด้วยเครื่อง Texture Analyzer TA-XT2 ใช้หัววัดสแตนเลส P0.25S ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 mm ตามวิธีของ Lanier (1992) รายละเอียดในภาคผนวก ข.1

3.4.7.2 วัดสีของเจลซูริมิโดยใช้เครื่องวัดสีเจลในระบบ CIE L* a* b* ด้วยเครื่อง Minolta Chromameter โดยใช้แหล่งกำเนิดแสง D_{65} มุมการมอง 10° คำนวณค่าความขาว (whiteness) โดยใช้สูตร ตามวิธีของ Lanier (1992) รายละเอียดในภาคผนวก ข.2

3.4.7.3 ทดสอบความแข็งแรงของเจลโดยวิธีพับ (folding test) ตามวิธีของ Lanier (1992) รายละเอียดในภาคผนวก ข.3

3.4.7.4 วัดความสามารถในการอุ้มน้ำของเจล (water holding capacity, WHC) ตามวิธีของ Ng (1987) รายละเอียดในภาคผนวก ข.4