

บรรณานุกรม

- ที เอ็ม บี เพื่อการส่งออก. 2550a. ฐานข้อมูล: ธุรกิจ สินค้า. ค้นได้จาก <http://www.news.thai.com/news/2007-09-04>. ค้นคว้าเมื่อ 6 ตุลาคม 2552.
- ที เอ็ม บี เพื่อการส่งออก. 2550b. ฐานข้อมูล: การตลาดปลา. ค้นได้จาก http://www.businessthaib.com/bt/content.php?data=406271_SMEs%20Marketing. ค้นคว้าเมื่อ 6 ตุลาคม 2552.
- ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย. 2550. ฐานข้อมูล: ปรานิลไทย : ตลาดขยายตัวทั้งในประเทศและส่งออก. ค้นได้จาก: <http://www.positioningmag.com/prnews/prnews.aspx?id=62988>. ค้นคว้าเมื่อ 30 มิถุนายน 2552.
- สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ ประจำสหภาพยุโรป. 2550. ฐานข้อมูล: สถานการณ์ของอุตสาหกรรม การส่งออกปลาในในตลาดโลก. ค้นได้จาก: <http://www.coastalacqua.com/webboard/index.php?topic=169.0>. ค้นคว้าเมื่อ 6 ตุลาคม 2552.
- สุวรรณ วิรัชกุล. 2544. โปรตีนปลา: ซูริมิและอาหารทะเลจากซูริมิ. ขอนแก่น: หจก. ขอนแก่นการพิมพ์. 249 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. ฐานข้อมูล: ข่าวการผลิต การตลาด ผลผลิตผลการเกษตร: ประมง. ค้นได้จาก: <http://www.ryt9.com>. ค้นคว้าเมื่อ 25 มิถุนายน 2552.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ฐานข้อมูล: ข่าวการผลิต การตลาด ผลผลิตผลการเกษตร: ประมง. ค้นได้จาก: <http://www.ryt9.com/economy>. ค้นคว้าเมื่อ 20 สิงหาคม 2553.
- An H, Peter MY, Seymour TA. 1996. Role of endogenous enzymes in surimi gelation. Trends Food Sci Technol 7:321-327.
- An H, Seymour TA, Wu J, Morrissey MT. 1994a. Assay and characterization of Pacific whiting (*Merluccius productus*) proteinase. J Food Sci 59: 277-281.
- An H, Weerasinghe V, Seymour TA, Morrissey MT. 1994b. Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi protein. J Food Sci 59: 1013-1017.
- Bigelow W, Lee CM. 2007. Evaluation of various infused cryoprotective ingredients for their freeze-thaw stabilizing and texture improving properties in frozen Red Hake muscle. J Food Sci 72:56-64.
- Benjakul S, Chantarasuwan C, Visessanguan W. 2003a. Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi from tropical fish. Food Chem 82: 567-574.
- Benjakul S, Visessanguan W, Tueksuban J. 2003b. Heat-activated proteolysis in lizardfish (*Saurida tumbil*) muscle. Food Res Int 36:1021-1028.
- Benjakul S, Visessanguan W, Tueksuban J, Tanaka M. 2004. Effect of some protein additives on proteolysis and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*). Food Hydrocolloid 18:395-401.

- Boye SW, Lanier TC. 1988. Effects of heat-stable alkaline protease activity of Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) on surimi gels. *J Food Sci* 53: 1340-1342.
- Cao MJ, Osatomi K, Tachibana K, Izumi T, Ishihara T. 1999. Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar protein. *J Food Sci* 64: 644-647.
- Cheng CS, Hamann DD, Webb NB. 1979. Effect of thermal processing on minced fish gel texture. *J Food Sci* 44:1080-1086.
- Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. 1991. Transglutaminase multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissue. *J Food Sci* 5 : 3071-3077.
- Hastings RJ, Keay JN, Yong KW. 1990. The properties of surimi and kamaboko gels from nine British species of fish. *Int J Food Sci Technol* 25: 281-294.
- Hu Y, Morioka K, Itoh Y. 2007. Hydrolysis of surimi paste from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) by cysteine proteinase cathepsin L and effect of the proteinase inhibitor (E-64) on gelation. *Food Chem* 104:702-708.
- Jiang ST, Her YH, Lee JJ, Wang JH. 1993. Comparison of the cathepsin D from makerel (*Scomber australasicus*) and milkfish (*Chanos chanos*) muscle. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57: 571-577.
- Klomklao S, Kishimura H, Benjakul S. 2008. Endogenous proteinase in true sardine (*Sardinops melanostictus*). *Food Chem* 107: 213-220.
- Klomklao S, Kishimura H, Benjakul S, Simpson BK. 2009. Autolysis and biochemical properties of endogenous proteinase in Japanese sandfish (*Arctoscopus japonicus*). *Int J Food Sci Technol* 44:1344-1350.
- Klomklao S, Kishimura H, Yabe M, Benjakul S. 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 147: 682-689.
- Ko WC, Liou SC. 1994. Thermal gelation properties of milkfish (*Chanos chanos*) cultured in Taiwan. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 41:574-577.
- Ladrat C, Verrez-Bagnis V, Noël J, Fleurence J. 2003. In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of saw bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effect of cathepsin B, D and L. *Food Chem* 81; 517-525.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lanier TC, Lin TS, Hamann DD, Thomas FB. 1981. Effect of alkaline protease in minced fish on texture of heat-processed gels. *J Food Sci* 46: 1643-1645.

- Lin TS, Lanier TC. 1980. Properties of an alkaline protease from the skeletal muscle of Atlantic croaker. *J Food Biochem* 4; 17.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-275.
- Makindo Y, Akasaka T, Toyohara H, Ikeda S. 1982. Purification and properties of carp muscle cathepsin D. *J Food Sci* 47:647-652.
- Morrissey MT, Wu JW, Lin DD, An H. 1993. Effect of food grade proteinase inhibitor on autolysis and gel strength of surimi. *J Food Sci* 58: 1051-1054.
- Rawdkuen S, Benjakul S. 2008. Whey proyein concentrate: Autolysis inhibition and effects on the gel properties of surimi prepared from tropical fish. *Food Chem* 106:1077-1084.
- Rawdkuen S, Benjakul S, Visessanguan W, Lanier TC. 2007. Effect of cysteine proteinase inhibitor containing fraction from chicken plasma on autolysis and gelation Of Pacific whiting surimi. *Food Hydrocolloid* 21:1209-1216.
- Sano T, Ohno T, Otsuka-Fuchino H, Matsumoto JJ, Tsuchiya T. 1994. Carp natural actomyosin : thermal denaturation mechanism. *J Food Sci* 59 : 1002-1008.
- Schiavone R, Zilli L, Storelli C, Vilella S. 2008. Identification by proteome analysis of muscle proteins in sea bream (*Sparus aurata*). *European Food Research and Technology*. 227(5): 1403–1410.
- Shimizu Y, Machida R, Tajenanami S. 1981. Species variation in tha gel-forming characteristics of fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 47:95-104.
- Sirikan P, Raksakulthai N, Yongsawatdikul J. 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy(*Stolephorus indicus*). *Food Chem* 98: 678-684.
- Stoknes I, Rustad T, Mohr V. 1993. Comparative studies of the proteolytic activity of tissue extracts from cod (*Gadus morhua*) and herring (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 166:613-619.
- Suwansakornkul P, Itoh Y, Hara S. 1993. The gel-forming characteristics of lizardfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 1029.
- Suzuki T. 1981. *Fish and Kill Protein Processing Technology*. Applied Science Publisher. London. p 243-260.
- Toyohara H, Sakata T, Yamashita K, Kinishita M, Shimizu Y. 1992. Degradation of oval file fish meat gel cause by myofibrillar proteinase(s). *J Food Sci* 55:364-368.
- Visessanguan W, Menirio AR, Kim SM, An H. 2001. Cathepsin L: a predominant heat-activated proteinase in arrowtooth flounder muscle. *J Agric Food Chem* 498:2630-2540.

- Wan J, Kimura I, Satake M. 1995. Causes of inferior gel-forming ability of salmon muscle. *J Food Sci* 61: 711-715.
- Wang PA, Vang B, Pedersen AM, Martinez I, Olsen RL. 2011. Post-mortem degradation of myofibrillar heavy chain in intact fish muscle: Effect of pH and enzyme inhibitors. *Food Chem* 124: 1090-1095.
- Worratao A, Yongsawatdigul J. 2002. Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase. *J Food Biochem* 27: 35-51.
- Worratao A, Yongsawatdigul J. 2005. Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chem* 93: 651-8.
- Yamashita M, Konagaya S. 1991. Hydrolytic action of salmon cathepsin B and L muscle softening. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1917-1922.
- Yarnpakdee S, Benjakul S, Visessanguan W, Kijroongjana K. 2009. Autolysis of goatfish (*Mulloidichthys martinicus*) mince: Characterisation and effect of washing and skin inclusion. *J Food Sci* 114: 1339-1344.
- Yongsawatdikul J, Park JW, Virulhakul P, Viratchakul S. 2000. Proteolytic Degradation of tropical tilapia surimi. *J Food Sci* 65:129-133.
- Yongsawatdikul J, Piyadhamviboon P. 2004. Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. *Food Chem* 87:447-455.
- Yongsawatdikul J, Piyadhamviboon P, Singchan K. 2006. Gel-forming ability of small scale mud carp (*Cirrhiana microlepis*) unwashed and washed mince as related to endogenous proteinase and transglutaminase activity. *Eur Food Res Technol* 223: 769-774.

ภาคผนวก

ภาคผนวก
การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry ตามวิธีของ Lowry and others (1951)

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1.1 หลอดทดลอง
- 1.1.2 ปิเปตต์อัตโนมัติขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร
- 1.1.3 ทิปขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร
- 1.1.4 เครื่อง Vortex mixer
- 1.1.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

1.2 สารเคมี

- 1.2.1 คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 1.2.2 โซเดียมซิเตรท ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 1.2.3 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- 1.2.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 1.2.5 โฟลินฟีนอล (Folin-Ciocalteu phenol reagent)
- 1.2.6 ไทโรซีน (Tyrosine; Tyr)

1.3 วิธีการ

1.3.1 สารเคมี

(1) สารละลาย ก: นำคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 0.5 กรัม ผสมกับ โซเดียมซิเตรท ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 1 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(2) สารละลาย ข: นำโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จำนวน 20 กรัม ผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จำนวน 4 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(3) สารละลาย ค: นำสารละลาย ก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

(4) สารละลาย ง: นำโฟลินฟีนอล (Folin-Ciocalteu phenol reagent) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.3.2 ตูตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย ค 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 - 10 นาที

1.3.3 เติมสารละลาย ง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 - 30 นาที

1.3.4 นำสารละลายผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

1.3.5 หาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

1.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน (Tyrosine; Tyr)

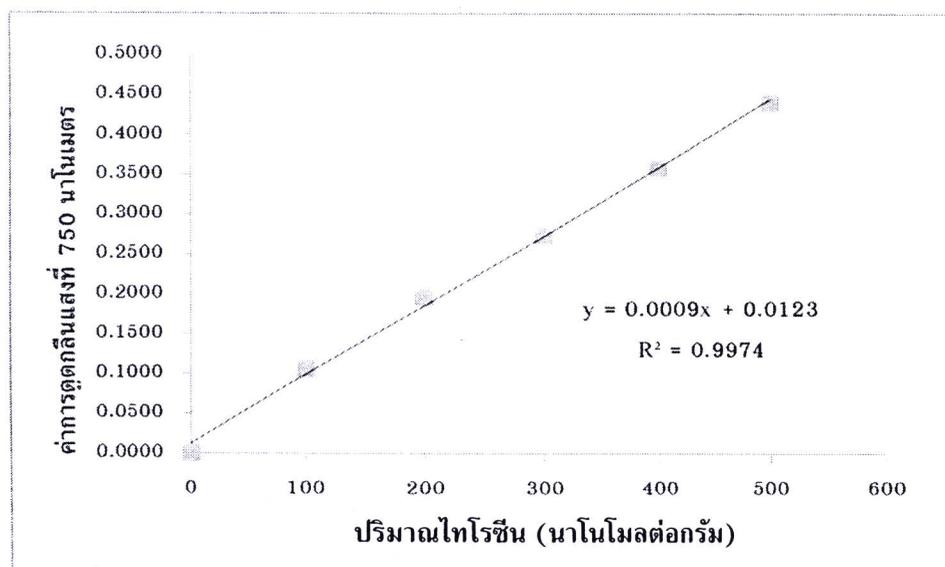
1.4.1 ดูดสารละลายโปรตีนมาตรฐานไทโรซีน (Tyrosine; Tyr) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 มิลลิลิตร

1.4.2 เติมสารละลาย ค 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 - 10 นาที

1.4.3 เติมสารละลาย ง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 - 30 นาที

1.4.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

1.4.5 เขียนกราฟมาตรฐาน และหาสมการการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีน กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (ภาพที่ 14) ปริมาณโปรตีนคำนวณได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานไทโรซีน



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานไทโรซีน โดยวิธี Lowry ตามวิธีของ Lowry and others (1951)

2. การศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ

2.1.2 เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ยี่ห้อ Ystral[®] รุ่น X10/25

2.1.3 หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร และฝาปิด

2.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์รูปแบบโปรตีน Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell ยี่ห้อ

BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210S ประเทศเยอรมัน

2.1.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

2.1.7 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ทางเคมี

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารละลายโซเดียม โดเดคซิล ซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) เข้มข้น 5% (w/v)

2.2.2 สารละลายโซเดียม โดเดคซิล ซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) เข้มข้น 10% (w/v)

2.2.3 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 6N

2.2.4 สารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.8

2.2.5 สารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง 6.8

2.2.6 สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($N_2H_8S_2O_8$) เข้มข้น 10%(w/v)

2.2.7 สารละลายโบโมฟีนอลบลู ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) 0.5% (w/v)

2.2.8 สารละลายอะคริลาไมด์/บิส อะคริลาไมด์

ซัง อะคริลาไมด์ (C_3H_5NO) 29.2 กรัม บิส อะคริลาไมด์ ($C_7H_{10}N_2O_2$) 0.8 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นกำจัดไอออน จากนั้นนำไปกรอง เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ก่อนใช้ต้องเอาอากาศออก (degas) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที)

2.2.9 Electrode buffer

ซัง Tris-HCL 30.3 กรัม ไกลซีน ($C_2H_5NO_2$) 144 กรัม และ โซเดียม โดเดคซิล ซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) 10 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นกำจัดไอออน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.10 Sample buffer

สารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง 6.8 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) 2.50 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียม โดเดคซิล ซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) เข้มข้น 10% (w/v) 2.00 มิลลิลิตร สารละลายโบโมฟีนอลบลู ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) 0.5% (w/v) 0.20 มิลลิลิตร เบต้า เมอร์แคปโตเอทานอล ($HS-CH_2CH_2OH$) 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นกำจัดไอออน 3.55 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2.11 สีย้อมแถบโปรตีน

ซังคูแมสซี บริลเลียนท์บลู R-250 ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$) 1.0 กรัม ละลายใน เมทานอล 100 มิลลิเมตร น้ำกลั่น 450 มิลลิเมตร และ กรดอะซิติก (CH_3COOH) 100 มิลลิเมตร

2.2.12 สารชะล้างสีย้อมแถบโปรตีน

เมทานอล (CH_3OH) 100 มิลลิเมตร กรดอะซิติก (CH_3COOH) 100 มิลลิเมตร และ น้ำกลั่น 800 มิลลิเมตร

2.3 วิธีการ

2.3.1 นำส่วนที่เป็นของเหลวใส่ไปเจือจางด้วยสารละลายโซเดียม โดเดคซิล ซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) เข้มข้น 5% (w/v) เพื่อปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้เท่ากันในทุกๆตัวอย่าง

2.3.2 ผสมสารละลายตัวอย่างกับ Sample buffer ในอัตราส่วน 1:2 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 30 ไมโครโมลต่อ 10 ไมโครลิตร

2.3.3 นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE โดยโหลดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของเจลอะครีลาไมด์สำหรับการแยก (running gel) ที่ 12% และความเข้มข้นของเจลสำหรับการทำให้โปรตีนในตัวอย่างเข้มข้นขึ้น (stacking gel) ที่ 4% ใช้ไฟฟ้าที่มีความต้านทานคงที่ 120 โวลท์ โดยสามารถเตรียมเจลได้ตาม ตารางที่ 2

2.3.4 นำไปหยุดการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน (fixed และย้อมสีสีย้อมแถบโปรตีน)

2.3.5 ล้างสีย้อมด้วยสารชะล้างสีย้อมแถบโปรตีน

ตารางที่ 2 ปริมาณสารในการเตรียมเจล(สำหรับเจลหนา 1 มิลลิเมตร จำนวน 2 แผ่น)

ชนิดของสาร	ปริมาณที่ใช้	
	Separating gel (12%)	Stacking gel (4%)
สารละลายอะครีลาไมด์/บิส อะครีลาไมด์	4.0 มิลลิเมตร	1.3 มิลลิเมตร
สารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8	2.5 มิลลิเมตร	-
สารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH6.8	-	2.5 มิลลิเมตร
สารละลายโซเดียม โดเดคซิล ซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) เข้มข้น 10% (w/v)	0.1 มิลลิเมตร	0.1 มิลลิเมตร
สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($N_2H_8S_2O_8$) เข้มข้น 10%(w/v)	50 ไมโครลิตร	50 ไมโครลิตร
TEMED(N,N,N',N' -tetramethylene-ethylenediamine) ($C_6H_{16}N_2$)	5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นกำจัดไอออน	3.4 มิลลิเมตร	6.1 มิลลิเมตร



