บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1 อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัตถุดิบ

ปลาโมง (Mong Fish; *Pangasius bocourti*) ที่ใช้ในการทดลองเป็นปลาโมงเลี้ยงจากกระชังเดียวกันขนาดน้ำหนักโดยเฉลี่ยตัวละ 1.2 – 1.5 กิโลกรัม สั่งซื้อจากแพปลาในจังหวัดนครพนม บรรจุใส่ถุงพลาสติกแล้ววางสลับกับชั้นน้ำแข็งในกล่องโฟมในอัตราส่วนเนื้อปลาโมงต่อน้ำแข็งเท่ากับ 1:2 (w/v) จากนั้นขนส่งมายังภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น ใช้ระยะเวลาตั้งแต่จับขึ้นมาจนกระทั่งขนส่งมายังภาควิชาประมาณ 4-6 ชั่วโมง

1.2 สารเคมี

สารเคมีเกรดสำหรับวิเคราะห์

1) กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid; TCA) ยี่ห้อ BDH
2) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ยี่ห้อ Merck
3) คอปเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$) ยี่ห้อ Univar
4) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ยี่ห้อ Univar
5) โซเดียมซิเตรท ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) ยี่ห้อ Univar
6) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ยี่ห้อ Merck
7) ทริสไฮโดรคลอริก (Tris HCl) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich
8) โฟลินฟีนอล (Folin-Ciocalteu' phenol reagent) ยี่ห้อ Fluka
9) ไทโรซีน (Tyrosine) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich
10) อะคริลาไมด์ (Acrylamide) (C_3H_5NO) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich
11) บิส อะคริลาไมด์ (*N,N'*-methylenebisacrylamide)($C_7H_{10}N_2O_2$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich
12) โซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) ยี่ห้อ Sigma – aldrich
13) TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylene-ethylenediamine) ($C_6H_{16}N_2$) ยี่ห้อ Sigma – aldrich
14) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich
15) เบต้า เมอร์แคปโตเอธานอล ($HS-CH_2\dot{C}H_2OH$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich

16) กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ยี่ห้อ Sigma – aldrich

17) โบโมฟีนอลบลู ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich

18) ไกลซีน ($C_2H_5NO_2$) ยี่ห้อ Merck

19) คูแมสซี บริลเลียนท์บลู R-250($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$) ยี่ห้อ Sigma – aldrich

20) เมธานอล (CH_3OH) ยี่ห้อ Merck

21) กรดอะซิติก (CH_3COOH) ยี่ห้อ Merck

22) 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanid-inobutane (E-64) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich

23) soybean trypsin inhibitor ยี่ห้อ Sigma – aldrich

24) Pepstatin A ยี่ห้อ Sigma – Aldrich

25) Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ยี่ห้อ Sigma – aldrich

1.3 อุปกรณ์

1) เครื่องบดเนื้อ ยี่ห้อ BIRO รุ่น 822 E97 ประเทศสหรัฐอเมริกา

2) เครื่องแช่แข็งแบบลมพ่น ยี่ห้อ RIVACOLD ประเทศไทย

3) เครื่องสับผสม ยี่ห้อ SEIT รุ่น 1878 wedel MASCHIEN ประเทศเยอรมัน

4) เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ ยี่ห้อ Super Vac รุ่น 021-336 ประเทศเยอรมัน

5) ตู้แช่แข็ง ยี่ห้อ SANYO รุ่น SF-C995 ประเทศไทย

6) อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ HAAKE รุ่น DC 30 ประเทศเยอรมัน

7) เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น S-20 ประเทศสหรัฐอเมริกา

8) เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ยี่ห้อ Ystral® รุ่น X10/25 ประเทศเยอรมัน

9) เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ยี่ห้อ Nissei รุ่น AM-8 ประเทศญี่ปุ่น

10) อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์รูปแบบโปรตีน Mini-PROTEAN® Tetra Cell ยี่ห้อ BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา

11) เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MARCH LEGEND®

12) เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Lamda 25 UV/VIS Spectrophotometer ประเทศสหรัฐอเมริกา

13) เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส ยี่ห้อ Stable Micro System รุ่น TA-XT2 texturometer TA.XPlus ประเทศอังกฤษ

14) เครื่องวิเคราะห์ความชื้น ยี่ห้อ Sartorius รุ่น MA30-000V3 ประเทศ

15) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น ED3202S ประเทศเยอรมัน

16) เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210S ประเทศเยอรมัน

17) อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ทางเคมี และกายภาพ

2 วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลาโมงบด

2.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำปลาโมงสดขนาด 1,200 – 1,500 กรัม ล้างน้ำสะอาด แล่เนื้อปลาด้วยมือ ควบคุมอุณหภูมิของเนื้อปลาโมงบดไม่ให้สูงเกิน 5 องศาเซลเซียส ทุกขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง แล้วบรรจุตัวอย่างในถุงโพลีเอธิลีน (polyethylene bag) ถุงละ 50 กรัม ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำเข้าแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการทดลองทั้งสิ้น 3 เดือน(ดัดแปลงจาก Benjakul 2003a)

2.1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลาโมงบด (ดัดแปลงจาก Morrissey and others 1993; Benjakul and others 2003a)

1) นำเนื้อปลาบด 3 กรัม บ่มที่ 45 50 55 60 และ 65 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นาน 90 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเย็น ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนส์ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA soluble peptide content) โดยวัดความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ละลายได้ที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดย Lowry Method (ภาคผนวก ข1)

2) นำเนื้อปลาบด 3 กรัม บ่มที่ 45 50 55 60 และ 65 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นาน 90 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย สารละลายโซเดียม โดเดซิลซัลเฟต อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนส์ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำไปต้มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปแล้วนำไปวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาคผนวก ข2)

3) การวางแผนการทดลอง

ทำการทดลองทั้งหมดจำนวน 2 ซ้ำ แต่ละชุดการทดลองวิเคราะห์ผลอย่างน้อย 2 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2.1.3 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลาโมงบด (ดัดแปลงจาก Yongsawatdikul and others 2000; Klomklao and others 2009)

1) การวัดนำเนื้อปลาบด 3 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ 12 มิลลิลิตร (McIlvain's buffer ซึ่งประกอบด้วย โซเดียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.2 M และโซเดียมซิเทรต ความเข้มข้น 0.1 M สำหรับช่วง pH 2.0 – 7.0 ส่วนช่วง pH 8.0-12.0 ใช้ glycine-sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.1 M) โดยช่วง pH ที่ศึกษาคือ pH เท่ากับ 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 และ 12.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าการบ่มนานกว่า 60 นาที ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกอย่างมีนัยสำคัญ) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกที่เย็นที่มีความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนส์ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA soluble peptide content) โดยวัดความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ละลายได้ที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากการบ่มด้วย pH ต่าง ๆ โดย Lowry Method (ภาคผนวก ข1)

2) การวัดนำเนื้อปลาบด 3 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ 12 มิลลิลิตร โดยช่วง pH ที่ศึกษาคือ pH เท่ากับ 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 และ 12.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (จากการศึกษาเบื้องต้น) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายสารละลายโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนส์ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำไปต้มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปแล้วนำไปวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยหลังจากการบ่มด้วย pH ต่าง ๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาคผนวก ข2)

3) การวางแผนการทดลอง

ทำการทดลองทั้งหมดจำนวน 2 ซ้ำ แต่ละชุดการทดลองวิเคราะห์ผลอย่างน้อย 2 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2.1.4 การศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสต่อการทำงานเอนไซม์โปรตีเนสใน กล้ามเนื้อปลาโมงบด (ดัดแปลงจาก Benjakul and others 2003; Klomklao and others 2008)

1) เนื้อปลาบด 3 กรัม ผสมกับสารยับยั้งการเอนไซม์โปรตีเนสจนมีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้

- 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanid-inobutane (E-64) ความเข้มข้น 0.1 mM
- soybean trypsin inhibitor ความเข้มข้น 0.1 กรัม/ลิตร
- Pepstatin A ความเข้มข้น 0.03 mM
- Ethylenediamine tetraacitic acid (EDTA) ความเข้มข้น 2 mM

บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเย็น ความเข้มข้นร้อยละ 5 จนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนส์ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA soluble peptide content) โดยวัดความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ละลายได้ที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดย Lowry Method (ภาคผนวก ข1)

2) เนื้อปลาบด 3 กรัม ผสมกับสารยับยั้งการเอนไซม์โปรตีเนสจนมีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้

- 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanid-inobutane (E-64) ความเข้มข้น 0.1 mM
- soybean trypsin inhibitor ความเข้มข้น 0.1 กรัม/ลิตร
- Pepstatin A ความเข้มข้น 0.03 mM
- Ethylenediamine tetraacitic acid (EDTA) ความเข้มข้น 2 mM

บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย การเติมสารละลายสารละลายโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นร้อยละ 5 จนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนส์ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำไปต้มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปแล้วนำไปวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยหลังจากการบ่มด้วย pH ต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาคผนวก ข2)

3) การวางแผนการทดลอง

ทำการทดลองทั้งหมดจำนวน 2 ซ้ำ แต่ละชุดการทดลองวิเคราะห์ผลอย่างน้อย 2 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2.2 การศึกษาผลของการเซ็ตเจลต่อคุณภาพของเจลจากเนื้อปลาโมง

นำเนื้อปลาโมงบด สับผสมกับ NaCl ร้อยละ 2 ของน้ำหนักเนื้อปลา ปรับความชื้นของเนื้อปลาบดให้เป็นร้อยละ 78 โดยน้ำแข็ง ทำการสับผสมใน Hobart silent chopper เป็นเวลา 6 นาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการสับผสมไม่ให้สูงเกิน 15 องศาเซลเซียส นำมาบรรจุในถุงพลาสติก ทำการไล่อากาศและผนึกถุงโดยเครื่องปิดผนึกสุญญากาศ แล้วนำเนื้อปลาที่ผ่านการสับผสมและไล่อากาศบรรจุในท่อสแตนเลสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร จากนั้นนำมาเซ็ตเจลที่อุณหภูมิ ที่จะทำการศึกษาคือ 25 องศาเซลเซียส 120 นาที เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (Benjakul and others 2004) ก่อนให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 15 นาที และที่ 45 50 55 60 65 หรือ 70 องศาเซลเซียส 60 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 15 นาที และนำมาลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งนาน 10 นาที นำเข้าเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์

2.2.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านเนื้อสัมผัส (ดัดแปลงจากวิธีของ Yongsawatdikul and others (2004) และRawdkuen and Benjakul (2008))

นำตัวอย่างเจลที่เตรียมไว้ รอจนกระทั่งเจลมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) นำมาตัดเป็นท่อนยาว 2.5 เซนติเมตร เก็บไว้ในถุงพลาสติกเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ แล้วนำวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสโดยเครื่อง TA-XT2 โดยวัดค่าของแรงที่ทำให้เจลแตก (breaking force; strength) ในหน่วยกรัม และระยะทางก่อนเจลแตก (deformation; elasticity) ในหน่วยมิลลิเมตร ในการวิเคราะห์ลักษณะทางเนื้อสัมผัส ใช้อัตราเร็วในการกดเป็น 60 มิลลิเมตรต่อนาที โดยใช้หัวเจาะทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ

2.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำของเจล (water holding capacity)

ดัดแปลงจากวิธีของ Bigelow and Lee (2007) ดังนี้ นำกระดาษกรอง Whatman No.3 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร) จำนวน 3 แผ่นและกระดาษกรอง Whatman No.1 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.0 เซนติเมตร) จำนวน 1 แผ่น มาวางซ้อนทับกัน โดยให้กระดาษกรอง Whatman No.1 อยู่ด้านในสุด พับเป็นรูปทรงกระบอก ชั่งกระดาษกรองทั้งก่อนและหลังจากการใส่ตัวอย่างเจลน้ำหนัก 1.5 $\pm$0.3 กรัม จากนั้นนำไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง

ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1600×g (4,000 rpm) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีตัวอย่างอยู่ด้านในออกจากหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วเอาตัวอย่างเจลออกจากกระดาษกรอง นำตัวอย่างไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง รายงายผลเป็นร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสียไปของตัวอย่างเริ่มต้น (expressible moisture) ซึ่งมีวิธีคำนวณดังนี้

$$\text{Expressible moisture (\%)} = 100\ \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักตัวอย่างสุดท้าย})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

2.2.3 เจลที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆและให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 3 กรัม เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเย็น ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนส์ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดอะซิติก (TCA soluble peptide content) โดยวัดความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ละลายได้ที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดย Lowry Method (ภาคผนวก ข1)

2.2.4 เจลที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆและให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 3 กรัม เติมสารละลายสารละลายโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนส์ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำไปต้มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปแล้วนำไปวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาคผนวก ข2)

2.2.5 การวางแผนการทดลอง

ทำการทดลองทั้งหมดจำนวน 2 ซ้ำ แต่ละชุดการทดลองวิเคราะห์ผลอย่างน้อย 2 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95