ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ก1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 1999)

อุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้า
2. ภาชนะหาความชื้น (จานอลูมิเนียม พร้อมฝา)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงนำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ชั่งน้ำหนัก
2. กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลแตกต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3มิลลิกรัม
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในตู้อบความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น แล้วนำไปอบอีกกระทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ X 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

ก2. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 1999)

อุปกรณ์

1. เตาเผา
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ปิดสวิตช์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลง แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. เผาซ้ำอีกครั้ง ครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลแตกต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส และกระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

ก3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1999)

อุปกรณ์

1. เครื่องกลั่นโปรตีน
2. หลอดย่อยโปรตีน ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
3. เตาย่อยโปรตีน
4. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
5. ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยา : คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 1 ส่วน ต่อ โปแตสเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (K_2SO_4) 9 ส่วน
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักโดยปริมาตร)
4. สารละลายกรดเกลือ (HCl) เข้มข้น 0.02 นอร์มอล
5. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักโดยปริมาตร)

6. สารละลายอินดิเคเตอร์ : นำเมทิลเรด (methyl red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ผสมกับโบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในสารละลายเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างปริมาณ 0.5-1.0 กรัม ใส่ในหลอดย่อยโปรตีน
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยาปริมาณ 5 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 200 มิลลิลิตร
3. นำไปย่อยบนเตาย่อยโปรตีนจนได้สารละลายสีฟ้าใส
4. ทิ้งไว้ให้เย็นและเติมน้ำกลั่นปริมาณ 60 มิลลิลิตร
5. จัดอุปกรณ์กลั่น
6. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร และเติมสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักโดยปริมาตร) 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ 5-7 หยด แล้วนำมารองรับของเหลวที่กลั่นได้โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มอยู่ในสารละลายกรด ให้ความร้อนจนแอมโมเนีย (NH_3) ถูกกลั่นจนหมด
7. นำขวดรูปชมพู่ออกแล้วล้างปลายของอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวด แล้วไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วนสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.02 นอร์มอล
8. ทำ blank ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันตั้งแต่ข้อ 2-7

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 14.007 \times \text{Factor}}{W}$$

โดยที่

a = ปริมาณสารละลายกรดเกลือที่ใช้ (มิลลิลิตร)

b = ปริมาณสารละลายกรดเกลือที่ใช้กับ blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

14.0007 = น้ำหนักสมมูลย์ของไนโตรเจน

Factor = 6.25

ก4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1999)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ประกอบด้วยขวดก้นกลมสำหรับใส่ตัวทำละลาย ซอคเลต (soxhlet) เครื่องควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mantle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. โถดูดความชื้น
6. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
7. โถดูดความชื้น

สารเคมี

1. สารทำละลาย : ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petrolium ether)

วิธีการ

1. อบขวดก้นกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาด 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 1-2 มิลลิกรัม ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารทำละลายกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ในซอคเลต
4. เติมสารทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดหาไขมันปริมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 ต่อนาที
6. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลตและกลั่นกับสารทำละลาย จนเหลือสารละลายในขวดก้นกลมเพียงเล็กน้อยด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย
7. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียสจนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
8. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ X 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

ภาคผนวก ข การวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Lou, 1998)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร
2. นำมาโฮโมจีไนส์ให้ละเอียด แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 X g นาน 15 นาที
3. นำส่วนใสที่แยกได้ไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์หาปริมาณด่างที่ระเหยได้ (TVB-N) **และไตรเมทิลเอมีน** (TMA-N) **โดยวิธี** Conway unit (Hasegawa, 1987)

อุปกรณ์

1. จานคอนเวย์
2. Microburette
3. กระดาษกรอง

สารเคมี

1. Mixed indicator : ละลาย โบรโมครีซอลกรีน 0.01 กรัม และเมทิลเรด 0.02 กรัม ด้วยเอธานอล แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร
2. Inner ring solution : ละลาย กรดบอริก 10 กรัม ในเอธานอล 200 มิลลิลิตร แล้วเติม mixed indicator (จากข้อ 1) 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น
3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล
4. สารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว : ละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) 60 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ต้มนาน 10 นาที ทำให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง
5. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 4 : ละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก (CCl_3COOH) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร
6. สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 10 : เติมแมกนีเซียมคาร์บอเนต ($MgCO_3$) 10 กรัม ลงใน 100 มิลลิลิตร ของฟอร์มาลีน (Formalin) (สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น ร้อยละ 35) เขย่าให้เข้ากันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองทำให้เจือจาง 3 เท่าด้วยน้ำกลั่น

7. วาสลีน

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณ 8 มิลลิลิตร โฮโมจีไนส์ให้ละเอียด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร (เก็บตัวอย่างในน้ำแข็งขณะใช้)

ค1. การหาปริมาณด่างที่ระเหยได้ (TVB-N)

1. ทาวาสลีนที่ขอบฝาจานคอนเวย์
2. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในวงกลมชั้นนอกของจานคอนเวย์
3. ดูด Inner ring solution 1 มิลลิลิตร ลงในวงกลมชั้นในของจานคอนเวย์
4. ดูดสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอก แต่ให้อยู่คนละด้านกับสารละลายตัวอย่างที่ใส่ในข้อ 2
5. ปิดฝาจานคอนเวย์ให้สนิท
6. เอียงหรือหมุนจานคอนเวย์เบาๆ ให้สารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว ผสมกับสารละลายตัวอย่าง ระวังอย่าให้เกิดการผสมกับ Inner ring solution ที่วงกลมชั้นใน
7. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45-60 นาที หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง
8. เปิดฝาจานคอยเวย์ แล้วไตเตรทวงกลมชั้นใน ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสีเขียวจางหายไป จดปริมาตรกรดไว้คำนวณ
9. ทำ Blank โดยใช้สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{TVB-N (มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม ตัวอย่าง)} = \frac{(N)(14)(A-B)(V)(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

โดยที่

N = Normality ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท

A = มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท Blank

V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและสารละลายของกรดไตรคลอโรอะซีติก ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

ค2. การหาปริมาณไตรเมทิลเอมีน (TMA-N)

1. ทำเช่นเดียวกับการหา TVB-N ข้อ 1-3
2. เติม 1 มิลลิลิตรของสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 10 ผสมกับตัวอย่าง
3. ปิดฝาทันที แล้วค่อยๆเอียงหรือหมุนเบาๆให้สารละลายชั้นนอกผสมกัน
4. ดูดสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอก ปิดฝาแล้วค่อยๆ หมุนจานคอนเวย์
5. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
6. เปิดฝาจานคอยเวย์ แล้วไตเตรทวงกลมชั้นใน ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู จดปริมาตรกรดไว้คำนวณ
7. ทำ Blank โดยใช้สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 1 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{TMA-N (มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม ตัวอย่าง)} = \frac{(N)(14)(C-B(V)(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

โดยที่

N = Normality ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท

C = มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท Blank

V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและสารละลายของกรดไตรคลอโรอะซีติก ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

ภาคผนวก ง การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

ง1. การสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ (ดัดแปลงจาก An *et al.*, 1994)

สารเคมี

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.0

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 100 กรัม เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 จำนวน 300 มิลลิลิตร

2. โฮโมจีไนส์ให้ละเอียด นำมาหมุนเหวี่ยงแยกส่วนใสที่ความเร็วรอบ 17,500 X g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. นำส่วนใส (เอนไซม์ที่สกัดได้) มาใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

ง2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยวิธี Casein-TCA Lowry method **(ดัดแปลงจาก** An *et al.*, 1994)

สารเคมี

1. สารละลายเคซีนเข้มข้นร้อยละ 2

2. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 50 (เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสก่อนใช้)

3. สารละลายเม็กไอเวนบัฟเฟอร์ (McIlvaine Buffer) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 8.0: ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคาไฮเดรต (di-sodium hydrogen phosphate dodecahydrate) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ผสมกับโซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.0

วิธีการ

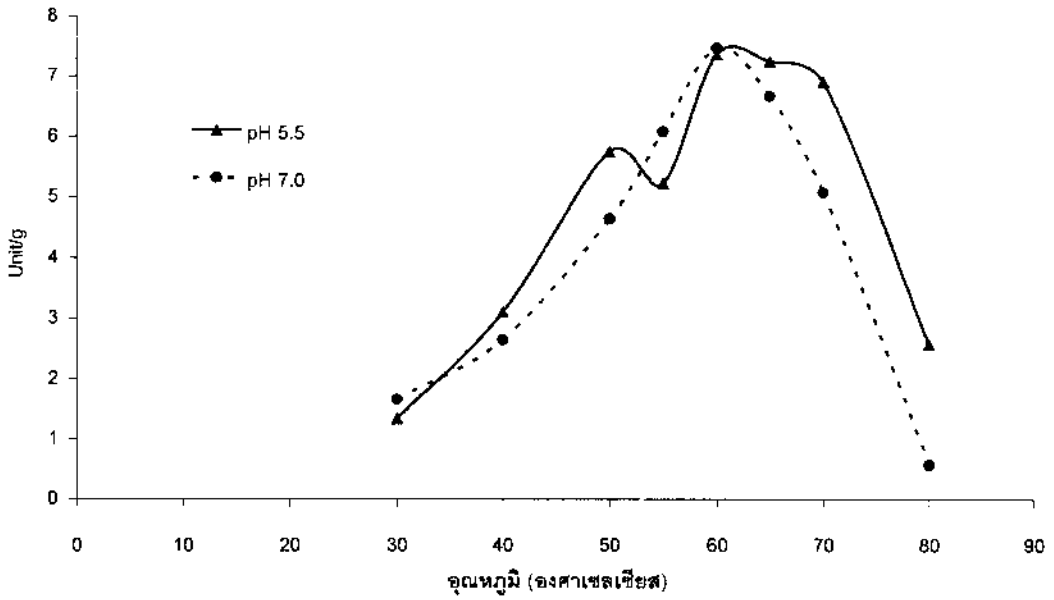
1. ผสม 625 ไมโครลิตร ของเม็กไอเวนบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ สารละลายเคซีน เข้มข้นร้อยละ 2 จำนวน 200 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาดเล็ก นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (สภาวะที่ใช้ในการบ่มได้มาจาก การทดลองบ่มเอนไซม์โปรติเอสที่สภาวะอุณหภูมิและที่สภาวะความเป็นกรดด่างที่ทำมีกิจกรรมสูงสุด ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ)

2. เติมเอนไซม์ที่สกัดได้ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 200 ไมโครลิตร นำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

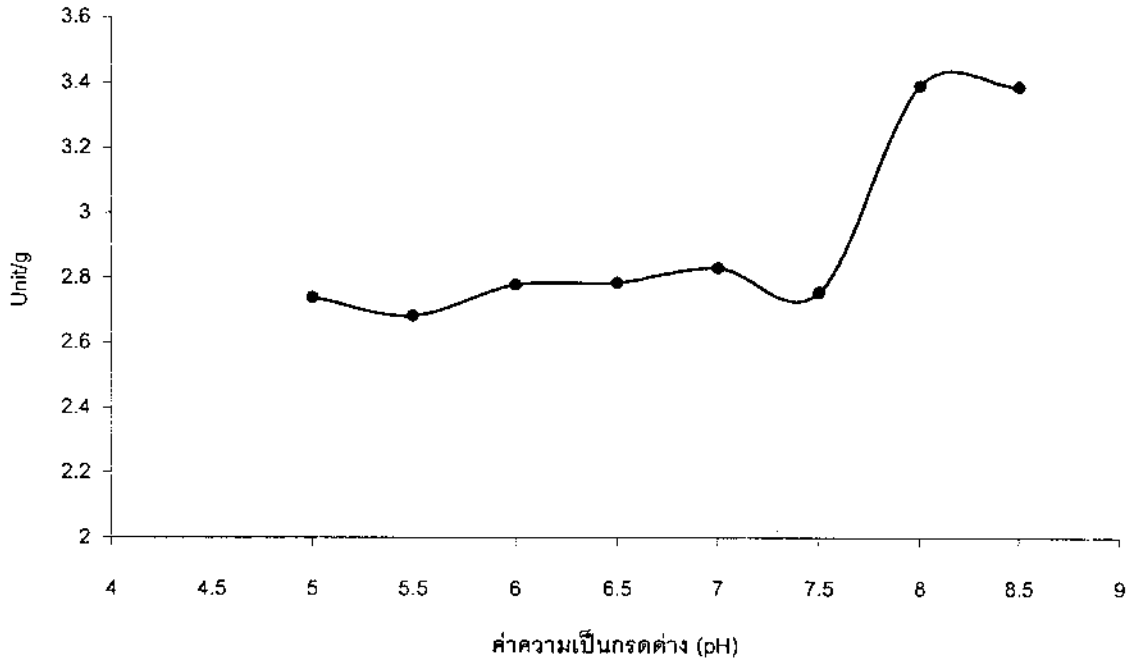
4. นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 6,500 X g นาน 5 นาที นำสารละลายส่วยใสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซิน

5. ทำ Blank โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 1 แล้วเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 200 มิลลิลิตร ก่อนการเติมเอนไซม์ 250 ไมโครลิตร แล้วนำมาเก็บในน้ำแข็ง



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำในสารละลายเม็กไอเวนบัฟเฟอร์เข้มข้น0.2 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 และ 7.0 ที่ สภาวะอุณหภูมิ 30 40 50 55 60 65 70 และ 80 องศาเซลเซียส

Activity of protease enzyme from black tiger shrimp muscle in 0.2 M McIlvaine buffer pH 5.5 and 7.0 at 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 and 80 °C



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำในสารละลายเม็กไอเวนบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 และ 8.5 ที่สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
Activity of protease enzyme from black tiger shrimp muscle in 0.2 M McIlvaine buffer pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 and 8.5 at 60 °C

ง3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย A: โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

2. สารละลาย B: คอปเปอร์ซัลเฟตร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมซิเตรทเข้มข้นร้อยละ 1

3. สารละลาย C: สารละลายโฟลีนฟีนอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) เข้มข้น 2 นอร์มอล โดยการนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น (1 ต่อ 1) ก่อนใช้

4. สารละลาย D: นำสารละลาย B จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลาย A จำนวน 50 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย D จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

2. เติมสารละลาย C 200 ไมโครลิตร ลงไปในสารละลายผสมข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

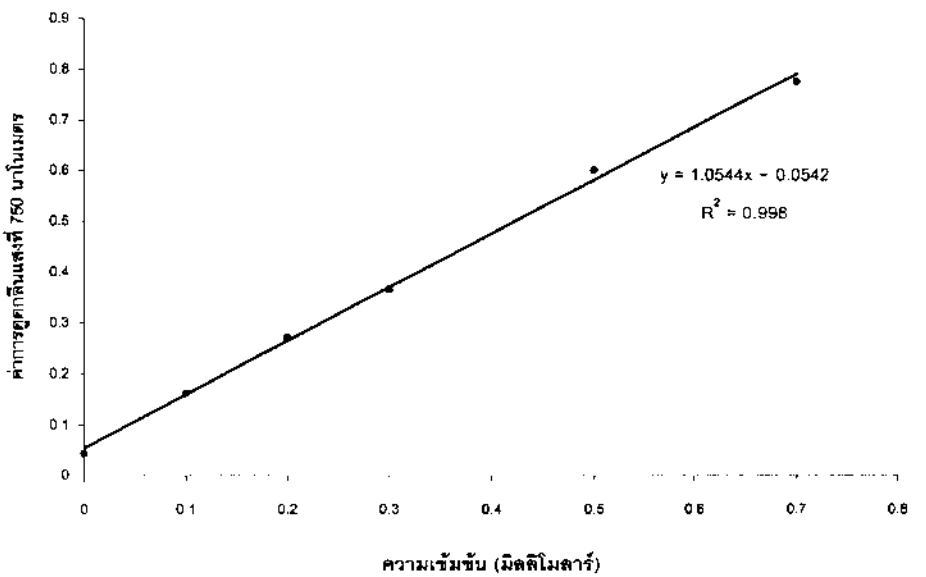
3. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซิน

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ดูดสารละลายไทโรซินเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 0 20 40 60 100 140 และ 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 ไมโครลิตร

2. นำสารละลายไทโรซินจากข้อ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาหาปริมาณโปรตีนเช่นเดียว กับตัวอย่าง

3. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไทโรซิน กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 3 ปริมาณโปรตีนคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานไทโรซิน



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method โดยใช้สารละลายไทโรซิน เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

Standard curve of protein quantitation by Lowry method using tyrosine as standard reagent

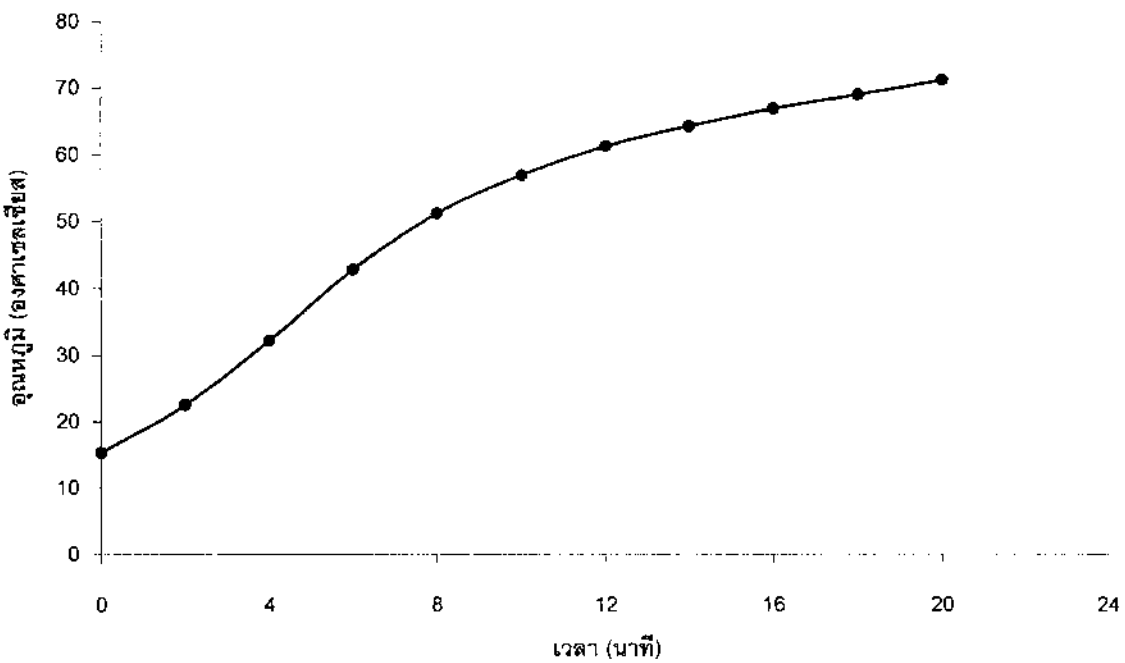
ง4 การวัดอุณหภูมิภายในเจลกุ้งกุลาดำที่เตรียมด้วยการให้ความร้อน

อุปกรณ์

1. เทอร์โมคอปเปิล

วิธีการ

1. สับผสมเจลกุ้งกุลาดำแล้วอัดลงในไส้เทียมสำหรับบรรจุชูริมิให้แน่น
2. เสียบเทอร์โมคอปเปิลลงไปตรงกลางของเจล
3. นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส
4. ทำการบันทึกอุณหภูมิเริ่มต้นและอุณหภูมิภายในเจลขณะทำการให้ความร้อนทุกๆ 2 นาที นาน 20 นาที
5. อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิภายในเจลแสดงดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 4



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 4 อุณหภูมิภายในเจลกุ้งกุลาดำที่บรรจุในไส้เทียมชูริมิขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร ขณะให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

Core temperature of mince black tiger shrimp packed in surimi casing (2.5 cm. in diameter, 10 cm. in long) heated at 90 $^{\circ}$C for 20 min

ภาคผนวก จ การตรวจสอบการละลายของโปรตีน

จ1 การตรวจสอบการละลายของโปรตีน (ดัดแปลงจาก Chawla *et al.*, 1996)

สารเคมี

1. สารละลาย S1: สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.6 โมลาร์

2. สารละลาย S2: สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ที่มี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) เข้มข้นร้อยละ 1

3. สารละลาย S3: S2 ที่มี สารละลายยูเรีย (Urea) เข้มข้น 8 โมลาร์

4. สารละลาย S4: S2 ที่มี สารละลายยูเรีย (Urea) เข้มข้น 8 โมลาร์ และสารละลายเบต้า-เมอแคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) เข้มข้นร้อยละ 2

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์

6. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 50 (แช่เย็นก่อนใช้)

7. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 10 (แช่เย็นก่อนใช้)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในสารละลาย S1 S2 S3 และ S4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2. นำมาเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

3. นำแต่ละชุดการทดลองทำการทดลองดังนี้

- นำชุดการทดลองสารละลาย S2 และ S3 มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 X g นาน 30 นาที

- นำชุดการทดลองสารละลาย S1มาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 X g นาน 30 นาที

- นำชุดการทดลองสารละลาย S4 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือด นาน 2 นาทีแล้วนำมาเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง และนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 X g นาน 30 นาที

4. นำส่วนใสที่ได้ จำนวน 10 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

5. นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 X g นาน 30 นาที แยกเอาส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 2 มิลลิลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 X g นาน 30 นาที แยกเอาส่วนใสทิ้ง

6. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนที่ได้และเติมลงในตัวอย่าง 1 กรัม ตั้งทิ้งไว้จนกว่าตะกอนและตัวอย่างจะละลายหมด

7. นำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรท เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) คำนวณปริมาณโปรตีนโดยหาร้อยละการละลายของโปรตีนเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ลงในตัวอย่างโดยตรงซึ่งเป็นชุดการทดลองที่มีร้อยละของการละลายของโปรตีนเท่ากับ 100

จ2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (Copeland, 1994)

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารละลายไบยูเรท: ชั่ง คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 1.5 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมทาเตรท 6.0 กรัม เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 300 มิลลิลิตร ในขณะกวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที

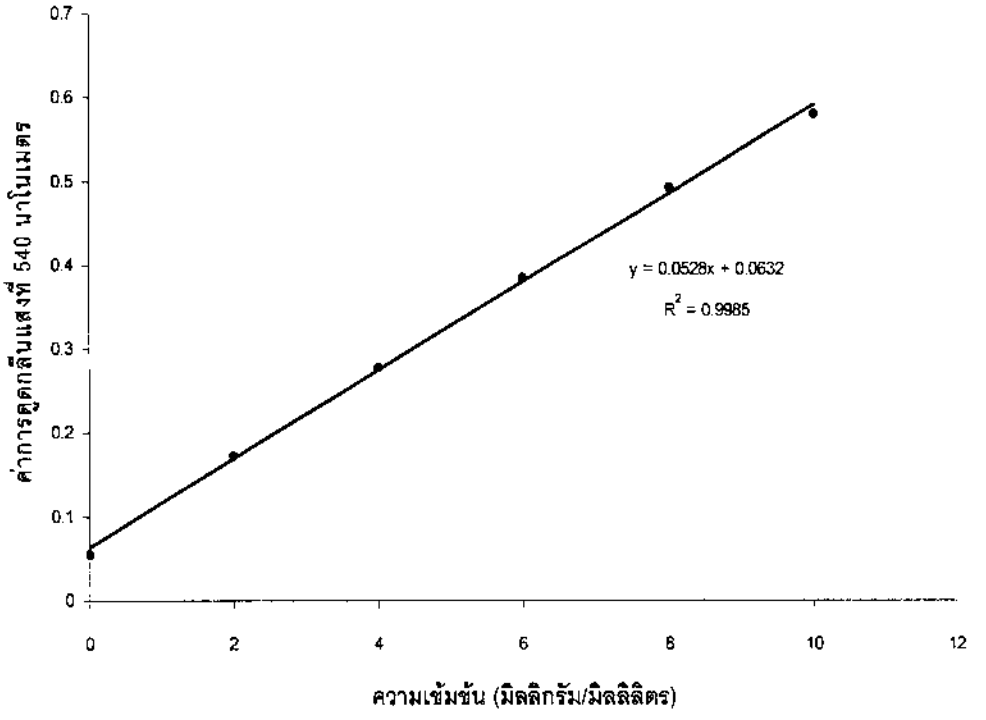
3. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ดูดสารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 200 300 400 และ 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 ไมโครลิตร

2. เติมสารละลายไบยูเรท จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 4 ปริมาณโปรตีนคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน BSA



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret method โดยใช้ Bovine Serum Albumin เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

Standard curve of protein quantitation by Biuret method using bovine serum albumin as standard reagent

ภาคผนวก ฉ การวัดค่าสี โดยใช้เครื่องวัดค่าสี

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ Hunter lab รุ่น Color Flex

วิธีการ

1. วางตัวอย่างลงบน Port ซึ่งมีขนาด 1 นิ้ว
2. ใช้ฝาครอบปิดตัวอย่าง เพื่อมิให้แสงรบกวนจากภายนอก
3. เริ่มวัดค่าสีโดยใช้ระบบสีของ CIE Color System ค่าที่วัดได้จะเป็นค่า L* a* และ b*

ภาคผนวก ช การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนไมโอไฟบริลโดยใช้วิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (**ดัดแปลงจาก** Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

1. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมินิเจล

สารเคมี

1. Acrylamide/bis-acrylamide: ละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน หลังจากเตรียม
2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.8
3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 6.8
4. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
5. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 5 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
6. Sample buffer (non reducing buffer):

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	0.1514	กรัม
กลีเซอรอล	2.5	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.25	กรัม
EDTA	0.0186	กรัม
โบรโมฟีนอลบลู	0.25	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

7. Sample buffer (reducing buffer):

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	0.1514	กรัม
กลีเซอรอล	2.5	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.25	กรัม
EDTA	0.0186	กรัม
เบต้า-เมอแคปโตเอธานอล	0.25	มิลลิลิตร
โบรโมฟีนอลบลู	0.25	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

8. Electrode buffer:

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	3.0	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

9. Catalyst ประกอบด้วย

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เตรียมก่อนใช้)

TEMED (N,N,N,N-tetramethyl ethylenediamine)

10. โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล High Molecular Weight (Sigma) ประกอบด้วย myosin, β-galactosidase, phosphorylase b, fructose-6-phosphate kinase, albumin, glutamic dehydrogenase, ovalbumin, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase มีน้ำหนักโมเลกุล 250,000 116,000 97,000 84,000 66,000 55,000 45,000 และ 36,000 ดาลตัน ตามลำดับ

11. สีย้อมโปรตีน Coomassie Billiant Blue R-250

12. Staining solution: ละลาย Coomassie Billiant Blue R-250 0.04 กรัม ในเมธานอล 100 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด แล้วเติม Glacial acetic acid 15 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 85มิลลิลิตร

13. Destaining solution 1: ผสมเมธานอล 200 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 30 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร

14. Destaining solution 2: ผสมเมธานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 75 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่าง 3 กรัม ผสมกับ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 27 มิลลิลิตร โฮโมจีไนส์ 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5,500 X g นาน 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาผสมกับ Sample buffer (อัตราส่วน 1:1) ให้มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ต้มสารผสมในน้ำเดือด นาน 3 นาที ทำให้เย็น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม running gel (10% gel) (สำหรับเจล 2 แผ่น)

30% Acrylamide/0.8% bis-acrylamide	3.333	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8	2.500	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4.012	มิลลิลิตร
10% SDS	100	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	50	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน

TEMED	5	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูดใส่ในแผ่นเจล แผ่นละ 3.5 มิลลิลิตร

3. การเตรียม stacking gel (สำหรับเจล 2 แผ่น)

30% Acrylamide/0.8% bis-acrylamide	0.665	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8	1.250	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.000	มิลลิลิตร
10% SDS	50	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	25	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน

TEMED	3	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทใส่ในแผ่นเจล

4. การแยกโปรตีนโดยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

ประกอบชุดเจลอิเลคโตรโฟรีซีส จากนั้นเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber ด้านใน จากนั้น load ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 จำนวน 5 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเติม electrode buffer ใน chamber ด้านนอก ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสเข้ากับ power supply เปิดกระแสไฟฟ้า 30 mA (สำหรับเจล 2 แผ่น) รอจนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่จนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้า

5. การย้อมสีโปรตีนในเจล

นำเจลมาย้อมสีโดยแช่ใน Staining solution นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ใน Destaining solution 1 นาน 15 นาที แล้วนำมาแช่ทิ้งไว้ข้ามคืนใน Destaining solution 2

ภาคผนวก ช การตรวจสอบค่า Thiobabituric acid-reactive substance (TBARS) (Buege and Aust, 1978)

สารเคมี

1. TBA solution: ละลาย Thiobabituric acid (TBA) 1.875 กรัม และกรไตรคลอโรอะซีติก 75 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.25 โมลาร์ 10.45 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

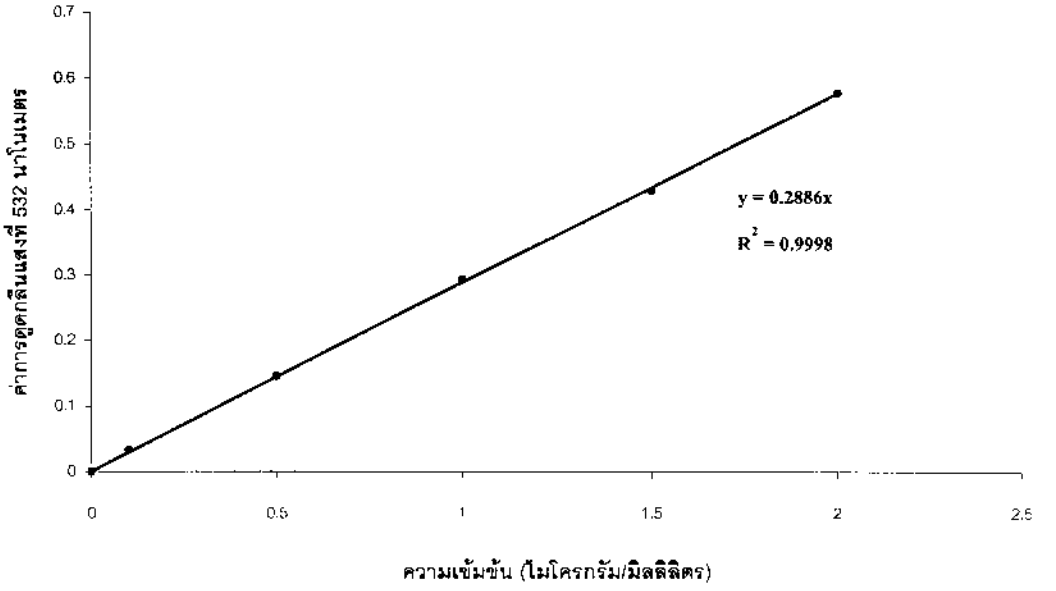
2. Blank solution: ละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 75 กรัมในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.25 โมลาร์ 10.45 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม เติม TBA solution 2.5 มิลลิลิตร โฮโมจีไนส์ นาน 1 นาที
2. นำมาต้มในน้ำเดือด (95-100 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที ทำให้เย็น
3. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,600 X g นาน 25 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน malonaldehyde
4. ทำ Blank โดยการใช้ตัวอย่างผสมกับ Blank solution แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ดูดสารละลาย malonaldehyde เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0 10 50 100 150 และ 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ไมโครลิตร
2. นำสารละลาย malonaldehyde จากข้อ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาหาค่า TBARS เช่นเดียวกับตัวอย่าง
3. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย malonaldehyde กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 5 ค่า TBARS คำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน malonaldehyde



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาค่า TBARS โดยใช้ malonaldehyde เป็นสารละลายมาตรฐาน

Standard curve of TBARS quantitation using malonaldehyde as standard reagent

ภาคผนวก ฌ การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำของผลิตภัณฑ์

ฌ1. การตรวจสอบการสูญเสียน้ำหนัก

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนและหลังการแปรรูป (ให้ความดันหรือความร้อน)

การคำนวณ

$$\text{การสูญเสียน้ำหนัก (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักก่อนและหลังการแปรรูป}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนการแปรรูป}} \times 100$$

ฌ2. การตรวจสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (Jatuphong *et al.*, 2000)

อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 50 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร
2. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. อุปกรณ์สำหรับหาปริมาณความชื้น ได้แก่ ตู้อบไฟฟ้า ภาชนะหาความชื้น (จานอลูมิเนียมพร้อมฝา) และโถดูดความชื้น

วิธีการ

1. นำตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นบางๆ
2. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม นำมาวางบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 50 จำนวน 1 แผ่น
3. ปิดทับด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 2 แผ่น พับกระดาษกรองแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 X g นาน 15 นาที
4. นำชิ้นตัวอย่างออกจากกระดาษกรอง แล้วนำกระดาษกรองมาชั่งน้ำหนัก
5. หาปริมาณความชื้นของตัวอย่าง (AOAC, 1999)

การคำนวณ

$$\text{ความสามารถในการอุ้มน้ำ (ร้อยละ)} = \frac{IWC - WL \times 100}{IWC}$$

โดยที่

IWC = ปริมาณความชื้นที่มีในตัวอย่าง (AOAC, 1999) X น้ำหนักตัวอย่าง

WL = น้ำหนักของน้ำที่ออกมาจากตัวอย่างภายหลังการหมุนเหวี่ยง

ภาคผนวก ญ การตรวจสอบคุณลักษณะเนื้อสัมผัส

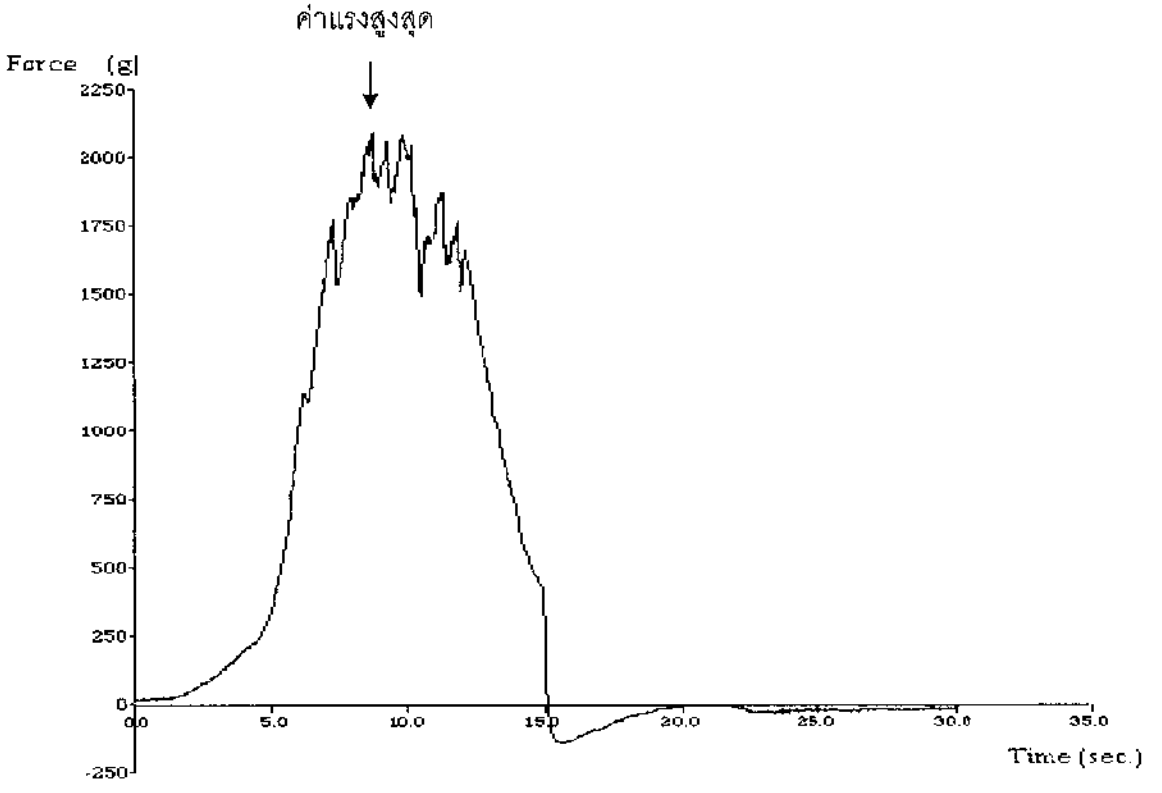
ญ1. การวัดค่าด้านแรงเฉือน (ดัดแปลงจาก Srinivasan *et al.*, 1997)

อุปกรณ์

1. เครื่อง Texture Analyzer ยี่ห้อ STABLE MICRO SYSTEM รุ่น TA-Xi2

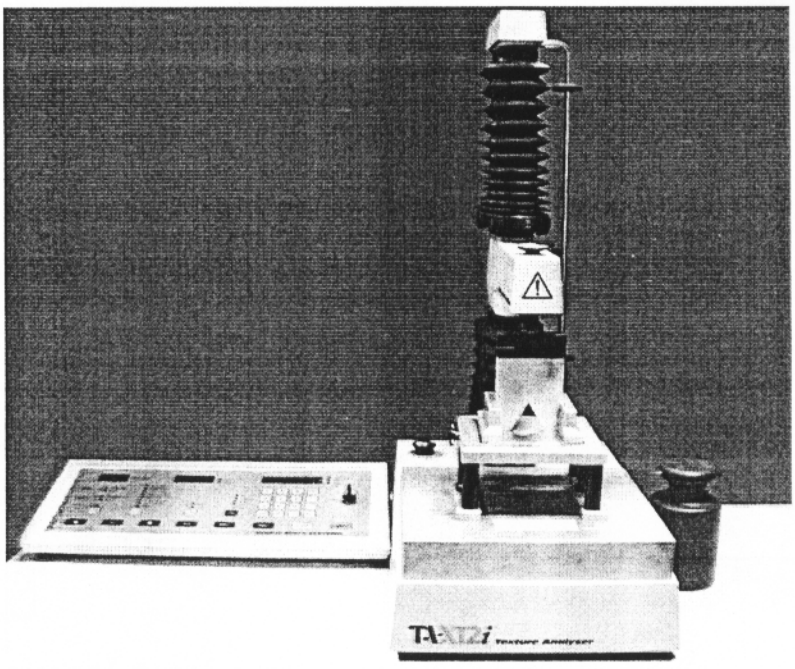
วิธีการ

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำมาวัดค่าแรงเฉือน โดยใช้ Warner-Blatzler Blade ความเร็ว 2 มิลลิเมตรต่อวินาที ทำการตัดตัวอย่างจนขาดออกจากกัน วัดค่าแรงสูงสุดที่ใช้ รายงานผลเป็นหน่วยกรัม (g) (ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 7) อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้แสดงดังภาพ ประกอบภาคผนวกที่ 8



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 7 กราฟแสดงการวัดค่าแรงเฉือนโดยใช้ Warner Bratzler Blade

Plot of determination of shear force value by using Warner Bratzler Blade head.



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 8 เครื่อง TA-Xi2 Texture Analyzer ติดตั้งหัว Warner Bratzler Blade

TA-Xi2 Texture Analyzer by using Warner Bratzler Blade head.

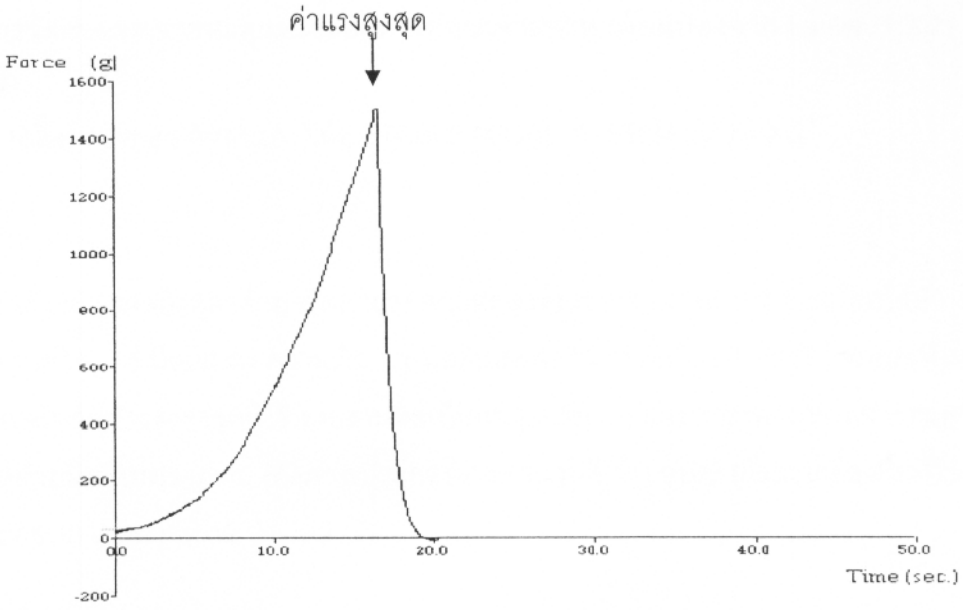
ญ2. การวัดค่าต้านแรงกด (ดัดแปลงจาก Lanier, 1992)

อุปกรณ์

1. เครื่อง Texture Analyzer ยี่ห้อ STABLE MICRO SYSTEM รุ่น TA-Xi2

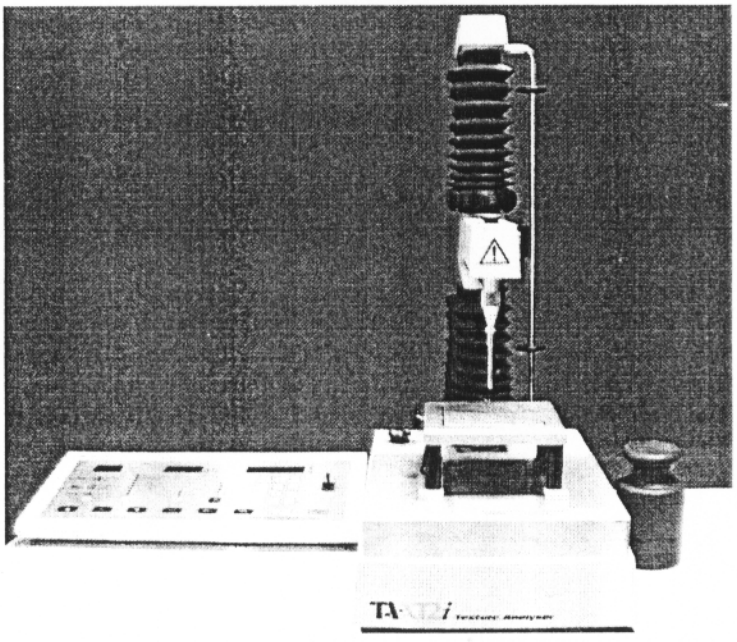
วิธีการ

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำมาวัดค่าแรงกด โดยใช้หัว Cylinder เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ความเร็ว 2 มิลลิเมตรต่อวินาที กดตัวอย่างลงไป 5 มิลลิเมตร นาน 9 วินาที วัดค่าแรงสูงสุดที่ใช้ รายงานผลเป็นหน่วยกรัม (g) (ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 9) อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้แสดงดัง ภาพประกอบภาคผนวกที่ 10



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 9 กราฟแสดงการวัดค่าแรงกดโดยใช้หัว Cylinder

Plot of determination of compression force value by using cylinder head.



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 10 เครื่อง TA-Xi2 Texture Analyzer ติดตั้งหัว cylinder เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

TA-Xi2 Texture Analyzer by using cylinder head diameter 6 millimeter.

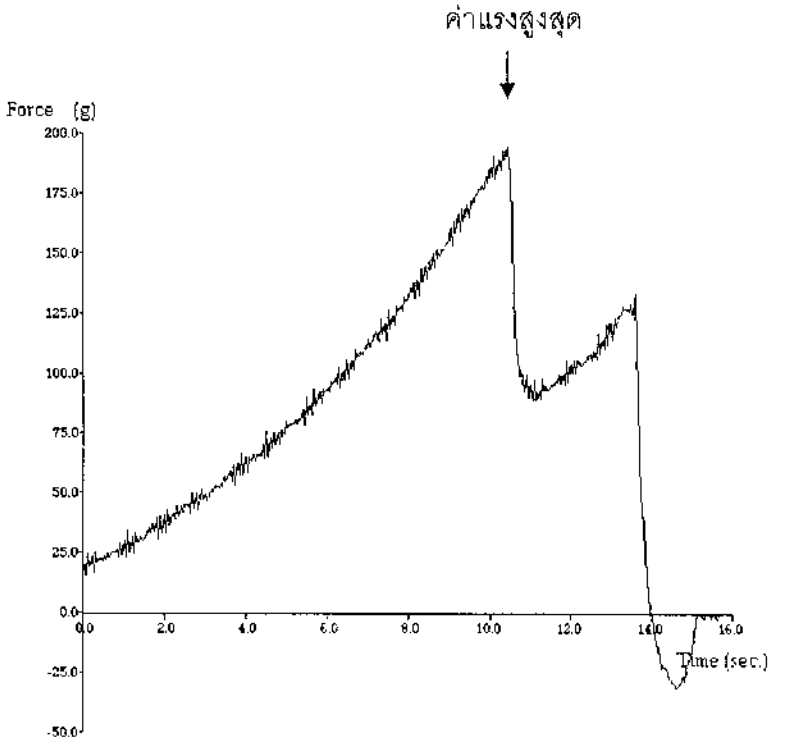
ญ3. การวัดค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุ (ดัดแปลงจาก Lanier, 1992)

อุปกรณ์

1. เครื่อง Texture Analyzer ยี่ห้อ STABLE MICRO SYSTEM รุ่น TA-Xi2

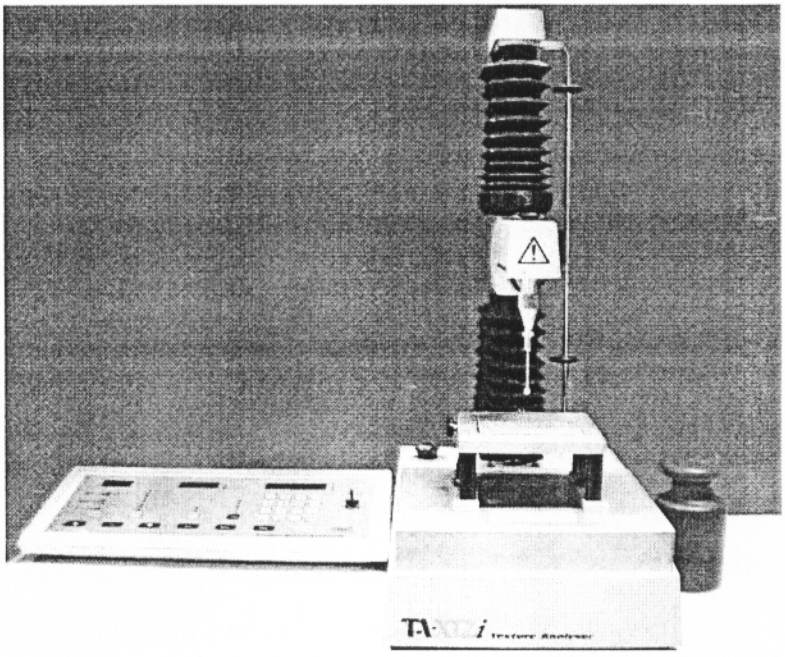
วิธีการ

นำตัวอย่างเจลกุ้งกุลาดำมาวัดค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุโดยใช้หัว plunger เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ความเร็ว 1.1 มิลลิเมตรต่อวินาที กดตัวอย่างลงไป จนกระทั่งเจาะทะลุเจลกุ้งกุลาดำ วัดค่าแรงสูงสุดที่ใช้ รายงานผลเป็นหน่วยกรัม (g) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิเมตร (mm) (ดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 11) อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้แสดงดังภาพประกอบภาคผนวกที่ 12



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 11 กราฟแสดงการวัดค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุ โดยใช้หัว plunger เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

Plot of determination of breaking force and deformation value by using 5 mm diameter plunger.



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 12 เครื่อง TA-Xi2 Texture Analyzer ติดตั้งหัว plunger เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

TA-Xi2 Texture Analyzer by using 5 mm diameter plunger.

ภาคผนวก ฎ การตรวจสอบการเสียสภาพของโปรตีนโดยใช้เครื่อง Differential scaning calorimeter (**ดัดแปลงจาก** Srinivasan *et al.*, 1997)

อุปกรณ์

1. aluminium pan

วิธีการ

1. สุ่มตัวอย่างกล้ามเนื้อกุ้งบริเวณตรงกลางลำตัว
2. ชั่งตัวอย่างใส่ใน aluminium pan ให้มีน้ำหนักตัวอย่างอยู่ในช่วง 10-20 มิลลิกรัม
3. ทำการปิดผนึกฝา aluminium pan
4. นำตัวอย่างไปหาอุณหภูมิและพลังงานที่ใช้ในการเสียสภาพของโปรตีน ใส่ตัวอย่างเข้าไปในเครื่อง DSC แล้วให้ความร้อนแก่ตัวอย่างจากอุณหภูมิ 20-95 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยทำการ calibrate เครื่องด้วย indium

ภาคผนวก ฏ วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคของเจลกุ้งกุลาดำ โดยวิธี Scanning Electron Microscope (SEM) **(ดัดแปลงจาก** Nip and Moy, 1988)

สารเคมี

1. สารละลายกลุทาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ในน้ำกลั่น ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตร

2. สารละลายเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 10 30 50 70 90 และ 100 ปริมาตรโดยปริมาตร

วิธีการ

1. ตัดตัวอย่าง ขนาด กว้างXยาวXหนา เท่ากับ 0.4X0.4X0.4 เซนติเมตร ใส่ในสารละลายกลูทาราลดีไฮด์ในน้ำกลั่น ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมง

2. ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

3. ดึงน้ำออก (dehydration) จากตัวอย่างโดยแช่ในสารละลายเอธานอล จากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง ดังนี้

ความเข้มข้นร้อยละ 10 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 30 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 50 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 70 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 90 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
ความเข้มข้นร้อยละ 100 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

4. ส่งตัวอย่างที่แช่ในสารละลายเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 100 เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคต่อไป

ภาคผนวก ฐ การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ฐ1. การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี Total viable count **แบบ** pour plate **(ดัดแปลงจาก** Speck, 1976)

อุปกรณ์

1. เครื่องตีปั่นไฟฟ้า (Stomacher)
2. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar (PCA)
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีปราศจากเชื้อ

2. นำตัวอย่างอาหารและสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เทในถุงพลาสติกเพื่อตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า โดยใช้ความเร็วระดับต่ำ เป็นระยะเวลา 2 นาที ตัวอย่างอาหารจะมีระดับความเจือจาง 1:10

3. เจือจางอาหารด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ให้มีระดับความเจือจางที่ต้องการ (1:100, 1:1000, 1:10000)

4. ปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจาง 3 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

5. เททับด้วยอาหาร PCA ประมาณ 15 มิลลิลิตร

6. หมุนจานเพาะเชื้อเบาๆแล้วตั้งทิ้งให้อาหารแข็งตัวประมาณ 15 นาที

7. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

8. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากการเพาะเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 30-300 โคโลนี และรายงานผลเป็นจำนวน Colony Forming Unit (CFU)/ กรัมตัวอย่าง

การคำนวณ

Total viable count (CFU/กรัมตัวอย่าง) = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี X ระดับความเจือจาง

ฐ2. การวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ แบบ pour plate (ดัดแปลงจาก Speck, 1976)

อุปกรณ์

1. เครื่องตีปั่นไฟฟ้า (Stomacher)
2. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar (PCA)
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีปราศจากเชื้อ

2. นำตัวอย่างอาหารและสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เทในถุงพลาสติกเพื่อตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า โดยใช้ความเร็วระดับต่ำ เป็นระยะเวลา 2 นาที ตัวอย่างอาหารจะมีระดับความเจือจาง 1:10

3. เจือจางอาหาร ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ให้มีระดับความเจือจางที่ต้องการ (1:100, 1:1000, 1:10000)

4. ปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจาง 3 ระดับ ระดับละ 2 ซ้ำ ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

5. เททับด้วยอาหาร PCA ประมาณ 15 มิลลิลิตร

6. หมุนจานเพาะเชื้อเบาๆแล้วตั้งทิ้งให้อาหารแข็งตัวประมาณ 15 นาที

7. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อ เป็นระยะเวลา 7 วัน

8. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากการเพาะเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 30-300 โคโลนี และรายงานผลเป็นจำนวน Colony Forming Unit (CFU)/ กรัมตัวอย่าง

การคำนวณ

Aerobic plate count (CFU/กรัมตัวอย่าง) = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี X ระดับความเจือจาง

ฐ3. การวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella spp.* (ดัดแปลงจาก Speck, 1976)

อุปกรณ์

1. เครื่องตีปั่นไฟฟ้า (Stomacher)
2. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Lactose broth (LB) เข้มข้นร้อยละ 0.5
2. Selenite cysteine broth (SCB)
3. Salmonella shigella agar (SSA)
4. Bismuth sulfite agar (BSA)
5. Xylose lysine desaxycholate (XLD) agar
6. Triple sugar iron (TSI) agar
7. Lysine iron agar (LIA)

วิธีการ

Pre-enrichment

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีปราศจากเชื้อ
2. นำตัวอย่างอาหารและ Lactose broth เข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เทใน ถุงพลาสติกเพื่อตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า โดยใช้ความเร็วระดับต่ำ เป็นระยะเวลา 2 นาที แล้วนำของผสมที่ได้มาเทใส่ในขวดดูแรนที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีปราศจากเชื้อ
3. นำมาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Selective enrichment

1. ปิเปตตัวอย่างอาหารมา 1 มิลลิลิตร จากขั้นตอน pre-enrichment ลงในอาหาร SCB 10 มิลลิลิตร
2. นำมาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

การเพาะเชื้อใน selective agar

1. Streak เชื้อจากขั้นตอน selective enrichment มาเพาะบน SSA BSA และ XLD agar อาหารละ 2 ซ้ำ
2. นำมาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นดังนี้

SSA: โคโลนีของเชื้อ *Salmonella spp.* จะไม่มีสี หรือสีชมพูอ่อน บางโคโลนีมีสีดำตรงกลาง

BSA: โคโลนีของเชื้อ *Salmonella spp.* จะสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำบางครั้งอาจมีโคโลนีที่สะท้อนแสง อาหารรอบๆ โคโลนีมีสีน้ำตาล

XLD agar: โคโลนีของเชื้อ *Salmonella spp.* จะสีชมพู บางโคโลนีมีสีดำตรงกลาง

การจำแนกและการทดสอบทางชีวเคมี

1. เลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Salmonella spp.* จาก SSA BSA และ XLD agar ถ่ายลงใน TSI agar และ LIA โดย streak บริเวณผิวหน้าอาหาร (slant) และ stab จนถึงก้นหลอดทดลอง (butt) อาหารละ 2 ซ้ำ

2. นำมาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Salmonella spp* ดังนี้

TSI agar: มีสีแดงที่ slant (สภาพเป็นด่าง) มีสีเหลืองที่ butt (สภาพเป็นกรด) อาจมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) โดยอาหารจะมีสีดำที่ butt

LIA: พบเชื้อที่สามารถเจริญได้ที่บริเวณผิวและบริเวณรอยแทงลูป (loop) อาหารมีสีม่วงทั่วหลอด หากมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) อาหารจะมีสีดำ

ภาคผนวก ฑ การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ฑ1. แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส สำหรับประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความสดของกุ้งกุลาดำสด ดัดแปลงจากวิธีของ กฤษณา โสภณพงษ์ (1996)

ชื่อ.....วันที่.....เวลา.....

คำแนะนำ กรุณาให้ระดับคะแนนความสดของตัวอย่างกุ้งกุลาดำในปัจจัยต่างๆ ตามความรู้สึกของท่านมากที่สุด

ระดับคะแนน	กลิ่น	เนื้อสัมผัส	สี
4	กลิ่นสด กลิ่นหวาน กลิ่นหญ้าหรือสาหร่าย	เนื้อแน่น	สีสม่ำเสมอ สีปกติของชนิดกุ้ง
3	กลิ่นเก่า อับ หรือไม่สด เล็กน้อย กลิ่นยีสต์เล็กน้อย กลิ่นคาวเล็กน้อย	เนื้อนิ่มเล็กน้อย	สีเปลี่ยนเล็กน้อย
2	กลิ่นอับ กลิ่นเปรี้ยวเล็กน้อย กลิ่นคาว กลิ่นอับเหมือนถุงเท้าเก่า	เนื้อกระด้าง นิ่มแห้ง	สีซีดจาง
1	กลิ่นเน่า กลิ่นแอมโมเนีย กลิ่นอุจจาระ กลิ่นสารเคมี น้ำมันปนเปื้อน	เนื้อนิ่ม-ยุ่ย	สีผิดปกติ

ปัจจัย	ระดับคะแนนความสด
1. สี	.....
2. การดมกลิ่น	.....
3. ลักษณะเนื้อสัมผัส	.....

ฑ2. แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Multiple Difference Test **สำหรับประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกุ้งกุลาดำในระหว่างการเก็บรักษา**

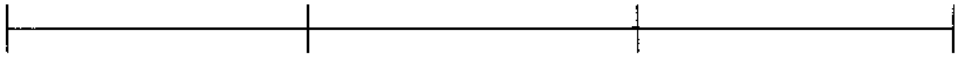
ชื่อ.....วันที่.....เวลา.....

คำแนะนำ โปรดทำการทดสอบคุณลักษณะด้านต่างๆของกุ้งกุลาดำ แล้วทำเครื่องหมายเส้นตรงตามขวางตั้งฉากกับสเกลแนวนอนที่ให้ไว้ เพื่อแสดงตำแหน่งที่ท่านได้ให้ไว้กับตัวอย่างในลักษณะนั้นๆ ตามที่ท่านเห็นว่าเหมาะสมที่สุดในการเป็นตัวแทนลักษณะนั้นๆของตัวอย่าง พร้อมทั้งเขียนรหัสของตัวอย่างบนเครื่องหมายเส้นตรงเพื่อแสดงว่าเส้นนั้นเป็นของตัวอย่างใด

โปรดทดสอบตัวอย่างเรียงตามลำดับต่อไปนี้

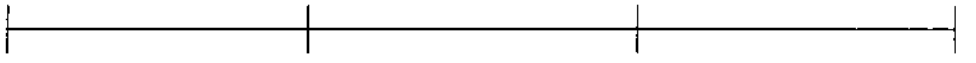
คุณลักษณะด้านประสาทสัมผัส

1 กลิ่นผิดปกติ



ไม่มีกลิ่น มีกลิ่นเล็กน้อย มีกลิ่นปานกลาง มีกลิ่นมาก

2 ลักษณะเนื้อสัมผัส



ไม่แข็ง แข็งเล็กน้อย แข็งปานกลาง แข็งมาก