บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

2.1.1. วัตถุดิบ

ซื้อกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตจังหวัดสงขลา คัดขนาดกุ้งกุลาดำที่มีสีน้ำตาลดำน้ำหนักใกล้เคียงกัน (60ตัว/ก.ก.) แช่ในน้ำแข็งอัตราส่วน กุ้ง:น้ำแข็ง เท่ากับ 1:2 (นน./นน.) บรรจุในกล่องโฟม และขนส่งมายังภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ นำมาหักหัวและปอกเปลือก บรรจุถุงพอลิเอทธีลีน และแช่ในน้ำแข็งให้มีอุณหภูมิระหว่าง 0-2 องศาเซลเซียส และทำการทดลองภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง ภายหลังปอกเปลือก

2.1.2 สารเคมี

2.1.2.1 สารประกอบฟอสเฟต

- Monopotassium phosphate (MKP; KH_2PO_4) จากบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- Sodium acid pyrophosphate (SAPP; $Na_2H_2P_2O_7$) จากบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- Tetra sodium pyrophosphate (TSPP; $Na_4P_2O_7$) จากบริษัท Ajec ประเทศออสเตรเลีย
- Sodium tripolyphosphate (STPP; $Na_5P_3O_{10}$) จากบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- Sodium hexametaphosphate {SHMP; $(NaPO_3)_{13}.Na_2O$} จากบริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน

2.1.2.2 เกลือ ($NaCl$, $MgCl_2$, $CaCl_2$) จากบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

2.1.2.3 สารเติมแต่ง:

- Brisol® จากบริษัท Mercury petrol (1995) ประเทศไทย
- แคปปา –คาราจีแนน จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
-แป้งมันสำปะหลังดัดแปร จากบริษัท Asia-Modified starch ประเทศไทย

2.1.2.4 สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

2.2 อุปกรณ์

2.2.1. ชุดอิเล็กโตรโฟริซีส ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น Mini-Protein II ประเทศสหรัฐอเมริกา และชุดอิเล็กโตรโฟริซีสชนิด gradient ยี่ห้อ Amersham Phamacia Biotech (SG-30) ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.2. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-16001 ประเทศออสเตรเลีย

2.2.3. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส ยี่ห้อ Stable Micro Systems รุ่น TA-XT2 ประเทศอังกฤษ

2.2.4. เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ยี่ห้อ Ultra turrax รุ่น T25B ประเทศมาเลเซีย

2.2.5. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC-5B plus ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.6. เครื่องกวนชนิดแม่เหล็กยี่ห้อ KIKAL labortechnik รุ่น RO 10 power ประเทศเยอรมันนี

2.2.7. เครื่องวัดค่าพีเอช ยี่ห้อ Scientific รุ่น Denver 15 ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.8. อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ W 350 รุ่น Memmert ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.9. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.2.10. เครื่อง Differential Scanning Colorimeter ยี่ห้อ PERKIN ELMER รุ่น DSC7 ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.11. เครื่อง Scanning electron microscope ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800LV ประเทศญี่ปุ่น

2.3 วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้สารประกอบฟอสเฟตสำหรับกุ้งกุลาดำ

1.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบฟอสเฟต

ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบฟอสเฟต โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้คือ

- ชนิดของสารประกอบฟอสเฟต

{MKP, SAPP, TSPP, STPP, SHMP}

- ความเข้มข้น (ร้อยละ 0 2.5 และ 5)

แช่กุ้งปอกเปลือกในสารละลายฟอสเฟตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ กันด้วยอัตราส่วนกุ้งต่อสารละลายเท่ากับ 1:2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการกวนตลอดเวลาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้สะเด็ดน้ำนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ตรวจสอบสมบัติและองค์ประกอบของตัวอย่างกุ้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่แช่น้ำ (C-N-S) และ ชุดควบคุมแช่น้ำ (C-S-W) ดังนี้คือ

- ค่าความเป็น กรด-ด่าง
- ปริมาณฟอสเฟต โดยวิธี AOAC (1999) (ภาคผนวก ก1)
- ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ โดยวิธี AOAC (1999) (ภาคผนวก ก2)
- ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนที่ถูกสกัดในสารละลายที่แช่กุ้ง โดยใช้ SDS-PAGE (10 % running gel และ 4% stacking gel) ตามวิธีของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก ก3)
- น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain)

นำกุ้งที่ผ่านการแช่สารละลายชุดการทดลองต่างๆ มาให้ความร้อนด้วยไอน้ำ เป็นเวลา 1 นาที และทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที ตรวจสอบน้ำหนักที่สูญเสียภายหลังการให้ความร้อน (cooking loss) ดังนี้คือ

$$\text{cooking loss (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : น้ำหนักก่อนให้ความร้อน

B : น้ำหนักหลังให้ความร้อน

- cooking yield โดยคำนวณผลผลิตของกุ้งที่ผ่านการให้ความร้อนเทียบกับน้ำหนักกุ้งสดเริ่มต้น (ก่อนการแช่สารละลาย)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (5x3) ในการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์(CRD ;Completely Randomized Design) ตรวจสอบความแปรปรวนโดย Analysis of Variance (ANOVA) และความแตกต่างโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980)

คัดเลือกชนิดของสารประกอบฟอสเฟตที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากชุดการทดลองที่ให้ผลผลิตสูงสุด

1.2 ศึกษาผลร่วมของความเข้มข้นของสารประกอบฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์

แช่กุ้งปอกเปลือกในสารละลายฟอสเฟตชนิดที่เหมาะสม (ข้อ1.1) ในสภาวะที่มีและไม่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

- สารประกอบฟอสเฟต (ร้อยละ 0 1.5 2.5 3.5)
- โซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 0 1.5 2.5 3.5)

โดยใช้อัตราส่วนกุ้งต่อสารละลายเท่ากับ 1:2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และมีการกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งให้สะเด็ดน้ำนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบสมบัติและองค์ประกอบของกุ้ง เช่นเดียวกับข้อ 1.1

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (4x4) ในการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์(CRD ;Completely Randomized Design) ตรวจสอบความแปรปรวนโดย Analysis of Variance (ANOVA)และความแตกต่างโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980)

คัดเลือกความเข้มข้นของสารประกอบฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากชุดการทดลองที่ให้ผลผลิตสูงสุด

1.3 ศึกษาผลร่วมของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ กับสารประกอบฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์

แช่กุ้งปอกเปลือกในสารละลายผสมระหว่างสารประกอบฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์ (ข้อ1.2) ร่วมกับเกลือแคลเซียมคลอไรด์หรือแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ

- ชนิดของเกลือ (แคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์)
- ความเข้มข้น (0 หรือ 1 หรือ 5 และ 10 มิลลิโมลาร์)

เติมกุ้งลงในสารละลายผสม ด้วยอัตราส่วนกุ้งต่อสารละลายเท่ากับ 1:2 (น้ำหนัก /ปริมาตร) โดยมีการกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งให้สะเด็ดน้ำนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบสมบัติและองค์ประกอบของกุ้ง เช่นเดียวกับข้อ 1.1 รวมทั้งตรวจสอบปริมาณแคลเซียมหรือแมกนีเซียม ตามวิธีของ AOAC (1999)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (2x4) ในการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์(CRD ;Completely Randomized Design) ตรวจสอบความแปรปรวนโดย Analysis of Variance (ANOVA)และความแตกต่างโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980)

คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมของการใช้แคลเซียมคลอไรด์หรือแมกนีเซียมคลอไรด์ร่วมกับสารประกอบฟอสเฟต และโซเดียมคลอไรด์โดยพิจารณาจากชุดการทดลองที่ให้ผลผลิตสูงสุด

1.4 ศึกษาระยะเวลาเหมาะสมของการแช่กุ้งกุลาดำในสารละลายฟอสเฟตร่วมกับโซเดียมคลอไรด์

แช่กุ้งปอกเปลือกในสภาวะที่เหมาะสม (ให้ผลผลิตสูงสุด) จากข้อ 1.1-1.3 โดยใช้ระยะเวลาในการแช่ต่างๆ กัน คือ 5 10 15 30 60 120 และ 240 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการกวนตลอดเวลาโดยใช้อัตราส่วนกุ้งต่อสารละลายเท่ากับ 1:2 (น้ำหนัก /ปริมาตร) ทิ้งให้สะเด็ดน้ำนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบสมบัติและองค์ประกอบของกุ้ง เช่นเดียวกับข้อ 1.1

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD; Completely Randomized Design) ตรวจสอบความแปรปรวนโดย Analysis of Variance (ANOVA) และความแตกต่างโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980)

คัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมของการแช่กุ้งกุลาดำในสารประกอบฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์โดยพิจารณาจากชุดการทดลองที่ให้ผลผลิตสูงสุด

ตอนที่ 2 ศึกษาการใช้สารเติมแต่งบางชนิดร่วมกับสารประกอบฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์

ศึกษาการใช้สารเติมแต่งบางชนิดร่วมกับสารประกอบฟอสเฟต และโซเดียมคลอไรด์ โดยเติมสารเติมแต่งชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันดังนี้คือ

1. Brisol® เข้มข้นร้อยละ 0 3 และ5
2. แคปปา–คาราจีแนน เข้มข้นร้อยละ 0 0.5 และ 1
3. แป้งมันสำปะหลังดัดแปร เข้มข้นร้อยละ 0 0.5 และ 1.0

แช่กุ้งปอกเปลือกในสารละลายผสมของสารเติมแต่ง Brisol® หรือ แคปปา-คาราจีแนน หรือแป้งมันสำปะหลังดัดแปร ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับสารประกอบฟอสเฟต และโซเดียมคลอไรด์ในสภาวะและเวลาที่เหมาะสม (ข้อ 1.4) โดยใช้อัตราส่วนกุ้งต่อสารละลายเท่ากับ 1:2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยมีการกวนตลอดเวลา ทิ้งให้สะเด็ดน้ำนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบสมบัติ และ

องค์ประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.1 รวมทั้งตรวจสอบความชอบโดยวิธี Hedonic Scale (9 คะแนน) ด้านสี ความใส ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบรวมของเนื้อกุ้งสุก (Meilgaard *et al.*, 1991) โดยใช้ผู้ทดสอบที่คุ้นเคยกับผลิตภัณฑ์กุ้ง จำนวน 30 คน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD; Completely Randomized Design) ตรวจสอบความแปรปรวน โดย Analysis of Variance (ANOVA) และความแตกต่างโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980)

คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมของการใช้สารเติมแต่งบางชนิดร่วมกับสารประกอบฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์โดยพิจารณาจากชุดการทดลองที่ให้ผลผลิตสูงสุด

ตอนที่ 3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและโครงสร้างของโปรตีนจากกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ

ตรวจสอบองค์ประกอบและสมบัติของโปรตีนของกล้ามเนื้อกุ้งที่ผ่านการแช่สารประกอบฟอสเฟตร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ในสภาวะที่เหมาะสม จากข้อ1.4 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำ และไม่แช่น้ำ) ดังนี้

3.1 องค์ประกอบของกล้ามเนื้อ (ภาคผนวก ข)

ตรวจสอบองค์ประกอบของกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำดังนี้คือ

- โปรตีน (AOAC, 1999) (ภาคผนวก ข1)
- ความชื้น (AOAC, 1999) (ภาคผนวก ข2)
- เถ้า (AOAC, 1999) (ภาคผนวก ข3)
- ไขมัน (AOAC, 1999) (ภาคผนวก ข4)
- โซเดียมคลอไรด์ (AOAC, 1999)

3.2 โปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (ภาคผนวก ค)

ทำการแยกส่วนสารประกอบไนโตรเจน ตามวิธีของ Hashimoto และคณะ (1979) โดยได้เป็นแฟรกชั่นต่างๆ ดังนี้ คือ

- สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน
- โปรตีนซาร์โคพลาสมิก
- โปรตีนไมโอไฟบริล
- โปรตีนที่ละลายได้ในด่าง
- สโตรมา

ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในแต่ละแฟรกชันโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1999) และตรวจสอบรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละแฟรกชั่นที่แยกได้ โดยใช้ SDS-PAGE (10 % running gel และ 4% stacking gel) ตามวิธีของ Laemmli (1970)

3.3 โครงสร้างจุลภาค โดยใช้ Scanning electron microscopy (SEM) โดยตรึงตัวอย่างในสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ เข้มข้นร้อยละ 2 ก่อนการดึงน้ำออกโดยใช้เอธานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แล้วเคลือบด้วย gold–palladium ก่อนนำไปตรวจสอบโครงสร้าง ตามวิธีของ Nip and Moy (1988)

3.4 ชนิดและปริมาณแร่ธาตุ

ตรวจสอบปริมาณ ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และคลอไรด์ โดยวิธี AOAC (1999)

3.5 Thermal inactivation rate constant (K_D) ของแอกโตไมโอซิน โดยวิธีของ Tsai และคณะ (1989) (ภาคผนวก ง)

3.6 คุณสมบัติทางความร้อนของกล้ามเนื้อ

ตรวจสอบการสูญเสียสภาพของกล้ามเนื้อโปรตีน เนื่องจากความร้อน โดยตรวจสอบจากค่า T_{max} และเอนธาลปีของโปรตีนกล้ามเนื้อโดยใช้ Differential scanning calorimeter (DSC) โดยใช้อัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 10

องศาเซลเซียส ต่อนาที จากอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ถึง 100 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Srinivasan และคณะ (1997a)

ตอนที่ 4 ศึกษาผลของสารประกอบฟอสเฟตต่อความคงตัวของโปรตีนในกุ้งกุลาดำ

4.1 ความคงตัวระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง

แช่แข็งกุ้งกุลาดำชุดควบคุม (กุ้งสดที่แช่น้ำอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและกุ้งสดที่ไม่แช่สารละลายใดๆ) และกุ้งกุลาดำที่แช่สารละลายฟอสเฟต (ข้อ 1.4) ให้มีอุณหภูมิกลางลำตัวเท่ากับ –18 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องแช่แข็งชนิด air–blast เก็บรักษากุ้งแช่แข็งในถุงพลาสติกชนิดพอลิเอทธิลีน ปิดผนึก และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 4 6 8 10 และ12 สัปดาห์ นำมาทำละลายโดยใช้น้ำไหลจนอุณหภูมิกลางลำตัวเท่ากับ 2-4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวิเคราะห์ต่างๆ ดังนี้คือ

4.1.1 ตรวจสอบ drip loss และ cooking loss

4.1.2 ตรวจสอบกิจกรรมของ ATPase ตามวิธีของ Benjakul และคณะ (1997) (ภาคผนวก จ1)

4.1.3 ตรวจสอบกิจกรรมของ α-glucosidase (AG) และ β-N–acetyl–glucosaminidase (NAG) ตามวิธีของ Benjakul และ Bauer (2000) (ภาคผนวก จ2)

4.1.4 ตรวจสอบการละลาย (solubility) ตามวิธี Xiong และคณะ (2000) (ภาคผนวกจ3)

4.1.5 ตรวจสอบปริมาณซัลฟ์ไฮดริล ตามวิธีของ Ellman (1959) (ภาคผนวก จ4)

4.1.6 ตรวจสอบปริมาณไดซัลไฟด์ ตามวิธีของ Thannhanser และคณะ (1987) (ภาคผนวก จ5)

4.1.7 ตรวจสอบไฮโดรโฟบิซิตี้ โดยใช้ 1–anilinonaphtalene–8–sulphoric acid ตามวิธีของ Benjakul และคณะ (1997) (ภาคผนวก จ 6)

4.2 ความคงตัวระหว่างการแช่แข็ง – ทำละลาย

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำ ชุดควบคุม (กุ้งสดที่แช่น้ำอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และกุ้งสดที่ไม่แช่สารละลายใดๆ) ชุดที่แช่สารละลายฟอสเฟต (ข้อ 1.4) มาแช่แข็ง–ทำละลาย โดยทำการแช่แข็งให้อุณหภูมิกลางลำตัวกุ้งเท่ากับ –18 องศาเซลเซียส (เวลา 12-15 ชั่วโมง) โดยเรียงตัวกุ้งเป็นตัวเดี่ยว ในถุงพอลิโพรพิลีน ก่อนการแช่แข็งโดยใช้ air–blast freezer และทำละลายให้มีอุณหภูมิกลางลำตัวเท่ากับ 2-4 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำไหล (เวลาประมาณ 20-30 นาที) ทำการแช่แข็ง-ทำละลาย เป็นจำนวนรอบเท่ากับ 0 1 3 และ 5 แล้วนำมาตรวจสอบองค์ประกอบต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 4.1

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD; Completely Randomized Design) ตรวจสอบความแปรปรวน โดย Analysis of Variance (ANOVA) และ ความแตกต่างโดย Duncan’s Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980)