# บทที่ 3

# การทดลอง

## 3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่มีอายุการเลี้ยงประมาณ 6 เดือน ขนาด 20-24 ตัวต่อกิโลกรัมหรือมีน้ำหนักเฉลี่ย 40-50 กรัม/ตัว จากฟาร์มกุ้งอำเภอสามพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ถูกขนส่งจากฟาร์มมายังจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในถังน้ำที่เติมออกซิเจนใช้เวลาขนส่งประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำกุ้งมาล้างด้วยน้ำสะอาดและคัดแยกกุ้งที่ตายแล้ว กุ้งที่มีเปลือกนิ่ม หรือกุ้งที่ไม่ได้ขนาดออก ใช้น้ำแข็งวางทับบนตัวกุ้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาทีเพื่อให้กุ้งตาย ล้างด้วยน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิไม่เกิน 5 °C อีกครั้ง ก่อนนำกุ้งมาบรรจุถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนแล้วปิดผนึก

การเตรียมตัวอย่างกุ้งก้ามกรามต้มสุก ให้นำ thermocouple เสียบไว้ที่บริเวณจุดกึ่งกลางของเนื้อกุ้งปล้องแรก ซึ่งเป็นส่วนของเนื้อกุ้งที่มีความหนามากสุด นำกุ้งไปนึ่งด้วยไอน้ำจนกระทั่งอุณหภูมิกึ่งกลางเนื้อกุ้งมีค่าเท่ากับ 70 °C (Mizuta et al., 1999) ใช้เวลาประมาณ 6-7 นาที ทำให้เย็นด้วยการผึ่งกุ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที แกะส่วนเปลือกของกุ้งออกให้เหลือเฉพาะส่วนเนื้อเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 การเสื่อมเสียคุณภาพของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

นำกุ้งก้ามกรามที่บรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนที่ปิดผนึกแล้ว มาเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ 4±1 ° C ระหว่างการเก็บรักษาให้สุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลทุกๆวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และวันที่ 10 และ 14 วัน โดยวิเคราะห์คุณสมบัติทางโครงสร้างกล้ามเนื้อ คุณภาพทางกายภาพและทางชีวเคมี ดังนี้

3.2.1.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกล้ามเนื้อในระดับต่ำกว่าจุลภาค ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Glauert, 1975; Bello et al., 1981; Grujic et al., 1993) ตัดเนื้อกุ้งตามขวางที่บริเวณปล้องแรกให้มีความหนาประมาณ 2 mm และนำมาตัดให้มีขนาด 1x1x1 mm ในสารละลาย fixative (2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7 ที่อุณหภูมิ 5 °C แช่ชิ้นเนื้อไว้ในสารละลาย fixative ประมาณ 2-4 ชั่วโมง และล้างสาร fixative ออกด้วยการเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 7 และเขย่าขวดเบาๆ ครั้งละ 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง ล้างชิ้นตัวอย่างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง แช่ชิ้นตัวอย่างใน 1% osmium tetraoxide ที่ละลายด้วยน้ำกลั่นนาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 5 ° C ล้างสารละลาย osmium tetraoxide ออกด้วยการเขย่าเบาๆ กับน้ำกลั่นครั้งละ 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำชิ้นตัวอย่างไป enblock ด้วย 5% uranyl acetate ที่ละลายใน 70 % alcohol นาน 30 นาที ขจัดน้ำออกจากตัวอย่างด้วย 70% alcohol และ dioxane จากนั้นให้นำตัวอย่างไปทำการ infiltration และ embedding ด้วยสารผสมพลาสติค (EPON 812) และให้ความร้อน(60°C, 16-18 ชั่วโมง) เพื่อให้พลาสติคแข็งตัว ตัดชิ้นตัวอย่างด้วยเครื่อง ultrathin ให้มีความหนาประมาณ 80 nm ย้อมสีด้วยสารละลาย 5% uranyle acetate และ lead acetate แล้วนำไปส่องดูโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (JEM-200CX; Jeol Ltd, Tokyo, Japan).

3.2.1.2 การวัดคุณภาพเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง Texturometer (Srinivasan et al., 1998) เตรียมตัวอย่างเนื้อกุ้งที่แกะเปลือกออกแล้วมาวางบนแท่นวางตัวอย่างของเครื่อง Texture analyzer (Model TA:XT21; Stable Micro System, Surrey, UK) เพื่อให้ใบมีด (blade set with knife) เลื่อนผ่านลงมาตัดชิ้นตัวอย่างให้ขาดจากกัน บันทึกค่าแรงสูงสุดที่ใช้ในการตัดตัวอย่างและนำมาหารด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางของเนื้อกุ้ง รายละเอียดในภาคผนวก ก. ค่าที่ได้แสดงผลเป็นนิวตัน/เซนติเมตร (N/cm)

3.2.1.3 คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส ประเมินคุณภาพด้านประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน (จำนวน 12 คน) เพื่อให้มีความชำนาญในการตรวจลักษณะการเสื่อมเสียเนื้อสัมผัสของกุ้งก้ามกราม โดยการเตรียมตัวอย่างกุ้งก้ามกรามทั้งดิบและสุกที่มีคุณภาพเนื้อสัมผัสแตกต่างกัน ตั้งแต่ดีมากคือ มีเนื้อสัมผัสแน่น (firm) คุณภาพดี : เนื้อสัมผัสค่อนข้างแน่นหรือนิ่มเล็กน้อย จนกระทั่งเนื้อกุ้งมีคุณภาพเสื่อมเสียมาก คือ มีเนื้อสัมผัสนิ่มเละ สาธิตถึงการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัส ด้วยการใช้นิ้วมือกดที่เนื้อกุ้ง(หลังจากแกะเปลือกออกแล้ว)ระหว่างปล้องแรกและปล้องที่สองของเนื้อกุ้ง สังเกตความรู้สึกของแรงต้านทานของเนื้อกุ้งที่มีต่อแรงกด รวมทั้งความสามารถในการคืนตัวของเนื้อกุ้งกลับสู่สภาพเดิม บันทึกผลการให้คะแนน (1-5 คะแนน) ในใบประเมินผลคุณภาพ (ภาคผนวก ข.) วิธีนี้เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกุ้งแช่เยือกแข็ง (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2529)

3.2.1.4 ปริมาณ hydrolytic degradation products (Morrissey et al., 1993) ชั่งเนื้อกุ้ง 3 g เติม 5% (w/v) trichloroacetic acid 27 mL ปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Ystral (series x 10/25, Ballrechten-Dottingen, Germany) นาน 3 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยแยกเครื่องหมุนเหวี่ยง (Universal 32 R, Hettich zentrifugen, Germany) ที่ความเร็วรอบ 5000xg 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวัดปริมาณ tyrosine โดยใช้ Lowry's method ในการวิเคราะห์ และใช้ tyrosine (L-Tyrosine, Sigma chemical Company) เป็นสารละลายมาตรฐาน

3.2.1.5 การสกัดโปรตีนแอคโตไมโอซิน (Mac Donald and Lanier, 1994) ชั่งเนื้อกุ้งบดละเอียด 10 g เติม 0.6 M KCl (pH 7 ที่มีอุณหภูมิ 5°C) 100 mL นำมาปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Ystral (series x 10/25, Ballrechten-Dottingen, Germany) นาน 4 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Universal 32 R, Hettich zentrifugen, Germany) ที่ความเร็วรอบ 5000xg นาน 30 นาที 0 °C นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาเติมน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 5 °C 300 mL ผสมให้เข้ากันและนำไปแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000xg 20 นาที 0 °C นำส่วนตะกอนที่ได้มาเติมสารละลาย 1.2 M KCl ที่มีอุณหภูมิ 5°C 20 mL ผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000xg 20 นาที 0 °C เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

การสกัดโปรตีนซาร์โคพลาสมิค (Jiang et al.,1991) ชั่งเนื้อกุ้งบดละเอียด 10 g เติมน้ำกลั่น (5°C) 50 mL นำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Ystral (series x 10/25, Ballrechten-Dottingen, Germany) นาน 2 นาที จากนั้นให้นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Universal 32 R, Hettich zentrifugen, Germany)ที่ความเร็วรอบ 7000xg 30 นาที 4°C เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

การสกัดโปรตีนที่สามารถละลายได้ทั้งหมด (Jiang et al.,1991) ชั่งเนื้อกุ้งบดละเอียด 5 g เติม 5% SDS จำนวน 50 mL นำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Ystral (series x 10/25, Ballrechten-Dottingen) นาน 2 นาที และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นจากนั้นให้นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Universal 32 R, Hettich zentrifugen, Germany) ที่ความเร็วรอบ 3500xg 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.1.6 การตรวจขนาดโมเลกุลของโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) นำสารละลายโปรตีนจากข้อ 3.2.1.5 มาทำการเจือจางด้วย sample buffer (10% SDS, 8 M urea with 0.5 M Tris HCl in 2-mercaptoethanol) ให้มีความเข้มข้นโปรตีนประมาณ 5-8 mg/ml ต้มประมาณ 2 นาทีและทำให้เย็น จากนั้นใช้ micro syringe ดูดสารละลายตัวอย่าง 5 μL ใส่ลงไปใน well ของ polyacrylamide gel (4% stacking gel, 12% running gel) ที่เตรียมไว้ load สารละลายมาตรฐานโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 20 – 200 kDa (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) ประกอบด้วย Myosin, rabbit muscle 205 kDa, β-galactosidase, E coli 116 kDa, Phosphorylase b, rabbit muscle 97.4 kDa, Albumin, bovine 66 kDa, Albumin, egg 45 kDa, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle 36 kDa, Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes 29 kDa and Trypsin inhibitor, soybean 20 kDa เพื่อใช้เป็นแถบโปรตีนอ้างอิง ให้กระแสไฟฟ้า 25 mA/gel นาน 3-4 ชั่วโมง นำแถบโปรตีนที่ได้มาย้อมสีด้วย 0.125 % Coomassie blue และล้างสีย้อมด้วยสารละลาย 5% methanol with 7% acetic acid

3.2.1.7 ค่าความเป็นกรดด่าง (AOAC, 1995) ชั่งเนื้อกุ้ง 25 g ปั่นผสม (Ystral; series x 10/25, Ballrechten-Dottingen)ในน้ำกลั่นจำนวน 50 mL แล้วนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter (Schott, CG 840, Germany)

3.2.1.8 คุณภาพทางจุลินทรีย์ โดยวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Maturin and Peeler, 1995) ชั่งตัวอย่าง 50 g ทำการเจือจางด้วย 0.1% sterile peptone water จำนวน 450 mL แล้วเขย่าด้วยเครื่อง stomached (AES laboratories, Mix 1, France) นาน 1 นาที นำสารละลายตัวอย่าง 1 mL มาเจือจางด้วย 0.1% sterile peptone water 9 mL จนกระทั่งได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสม แล้วปิเปตมา 0.1 mL ทำการ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) ที่เตรียมไว้แล้ว บ่ม plate ไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Lee and Kraft, 1992) การเตรียมสารละลายตัวอย่างเหมือนกับการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จากนั้นให้ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสมมา 0.1 mL ทำการ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ milk nutrient agar (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) บ่ม plate ไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C ไว้เป็นเวลา 1-3 วัน

3.2.1.9 ค่าร้อยละของการสูญเสียน้ำหนักเนื่องจากการเก็บรักษา (% drip loss) ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของกุ้งก้ามกราม (ประมาณ 10 ตัว/ถุง) ($M_1$) ก่อนนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อครบอายุการเก็บรักษา หรือถึงระยะเวลาในการสุ่มตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์ผล (ทุกๆ 1 วันและวันที่ 10 และ 14) ให้ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของกุ้งก้ามกรามอีกครั้ง ($M_2$)

$$\% \text{ drip loss} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad \text{.....(1)}$$

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely randomized design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**3.2.2 การเสื่อมเสียคุณภาพของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C**

นำกุ้งก้ามกรามสดที่บรรจุในถุงพลาสติกที่ปิดผนึกเรียบร้อยแล้ว มาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -65 °C (still freezer) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นให้นำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18±2 °C สุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลานาน 6 เดือน โดยวิเคราะห์คุณสมบัติทางโครงสร้างกล้ามเนื้อ คุณภาพทางกายภาพและทางชีวเคมี ดังนี้

3.2.2.1 ขนาดผลึกน้ำแข็ง (Martino and Zaritzky, 1988) ตัดเนื้อกุ้งที่บริเวณปล้องแรกในขณะที่ยังอยู่ในสภาพแช่แข็งให้มีความหนาประมาณ 0.5 cm แล้วแช่ในสารละลาย Carnoy fluid(60% absolute ethanol, 30% chloroform, 10% glacial acetic acid) ที่มีอุณหภูมิ -18°C ทันที เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -18°C ประมาณ 5-7 วัน ก่อนนำชิ้นตัวอย่างมาขจัดน้ำออกด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ alcohol(70-100%) นำตัวอย่างไปฝัง (embed) ลงในพาราฟิน และตัดชิ้นตัวอย่างด้วยเครื่อง rotary microtome (Jung Biocut 2035, Leica, Germany) ให้มีความหนาประมาณ 8-10 μm ย้อมด้วยสีย้อม Wright's Giemsa และนำไปส่องดูขนาดผลึกน้ำแข็งด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Nikon, FX-35 DX, Tokyo, Japan)

3.2.2.2 การวัดระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อ ดัดแปลงมาจาก Pan และ Yeh(1993) ตัดเนื้อกุ้งตรงตำแหน่งปล้องแรกตามขวางให้มีความหนาประมาณ 1-2 mm ดองตัวอย่างในสารละลาย Bouin's ( 75% picric acid, saturated aqueous; 25% formalin, concentrated; 5% glacial acetic acid) เพื่อช่วยให้โปรตีนจับตัวเป็นก้อนและรักษาโปรตีนไม่ให้เกิดการเน่าเสีย นอกจากนี้ยังเป็นการหลีกเลี่ยงการเกิดช่องว่างขนาดใหญ่ (large vacuoles) ภายในกล้ามเนื้อซึ่งเป็นผลมาจากการใช้ acetic acid ในปริมาณมาก ดองประมาณ 1 คืน ล้างชิ้นตัวอย่างด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง จากนั้นให้นำมาแช่ในสารละลาย 70% alcohol อีกหลายๆ ครั้งจนกระทั่งชิ้นตัวอย่างไม่มีสี ขจัดน้ำออกจากตัวอย่างด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ alcohol (70-100%) แล้วนำไป embed ด้วยพาราฟิน และตัดตัวอย่างด้วยเครื่อง rotary microtome (Jung Biocut 2035, Leica, Germany) ให้มีความหนาประมาณ 6 μm ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin นำไปส่องดูการเปลี่ยนแปลงของระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Nikon, FX-35 DX, Tokyo, Japan)

3.2.2.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกล้ามเนื้อในระดับต่ำกว่าจุลภาค (Glauert, 1975; Bello et al., 1981; Grujic et al., 1993) ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.1.1

3.2.2.4 การวัดคุณภาพเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง Texturometer (Srinivasan et al., 1998) ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.1.2

3.2.2.5 ปริมาณ thawing loss (AOAC, 1995) ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างก่อน ($M_1$) และหลังการละลายน้ำแข็ง ($M_2$)

$$\% \text{ thawing loss} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad \text{.....(2)}$$

3.2.2.6 คุณสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีน (Gormley et al., 2002) ชั่งตัวอย่างเนื้อกุ้งบดละเอียด(แช่เยือกแข็ง) 3 g ใส่ลงใน centrifuge tube ที่วาง Gilson pipetman filters 1 อัน ทิ้งไว้ให้ตัวอย่างละลายใน centrifuge tube แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Universal 32 R, Hettich zentrifugen, Germany)ด้วยความเร็วรอบ 1500 rpm 10 นาที 10 °C ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่เหลือหลังจากถูกแยกเอาน้ำออกแล้ว

$$\text{การอุ้มน้ำของโปรตีน (WHC)} = 100 - \frac{W_l}{W_i} \times 100 \ (\%) \quad \text{.....(3)}$$

เมื่อ $W_i$ = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

$W_l$ = น้ำหนักน้ำที่สูญเสียหลังจาก centrifuge

3.2.2.7 ปริมาณ hydrolytic degradation products (Morrissey et al., 1993) ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.1.4

3.2.2.8 การสกัดโปรตีนแอคโตไมโอซิน (Mac Donald and Lanier, 1994) และซาร์โคพลาสมิค (Jiang et al.,1991) ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.1.5

3.2.2.9 การตรวจขนาดโมเลกุลของโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.1.6

3.2.2.10 ค่าความเป็นกรดด่าง (AOAC, 1995) ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.1.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

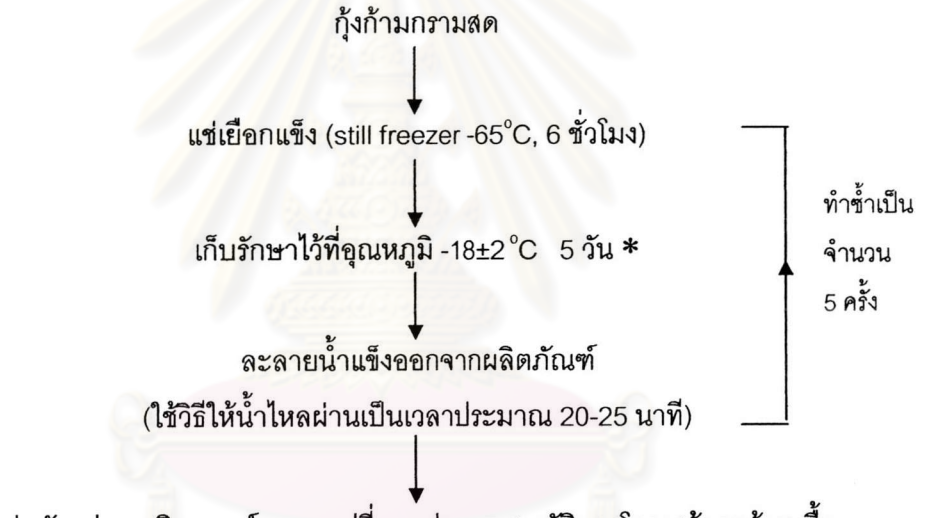
3.2.2.11 ปริมาณ $Ca^{2+}$ATPase activity (MacDonald and Lanier, 1994; Roura and Crupkin, 1995) ปิเปตสารละลายโปรตีนแอคโตไมโอซิน(2.5-4 mg/ml) 1 mL ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 30 mL เติม 0.5 M Tris-maleate, pH 7 0.6 mL และ 10 mM $CaCl_2$ 7.9 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นให้เติมสารละลาย 20 mM ATP 0.5 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 8 นาที แล้วจึงเติม 15%(w/v) Trichloroacetic acid (5°C) 5 mL นำสารละลายทั้งหมดไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3500xg นาน 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวัดปริมาณ inorganic phosphate(Pi) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer (Spectronic 20, Genesys, USA)ที่ความยาวคลื่น 820 nm และใช้ mono potassium phosphate (Sigma chemical Company) เป็นสารละลายมาตรฐาน 1 unit of $Ca^{2+}$ATPase activity มีค่าเท่ากับปริมาณ inorganic phosphate (μmole) ที่ถูกปลดปล่อยออกจากสารละลายโปรตีน (mg)/1 นาที หรือมีหน่วยเป็น μmole inorganic phosphate(Pi)/min/mg protein

วางแผนการทดลองเชิงสถิติแบบ Completely randomized design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**3.2.3 การเสื่อมเสียคุณภาพของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachuim rosenbergii*) ระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ**

นำกุ้งก้ามกรามที่บรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนที่ปิดผนึกแล้วมาแช่เยือกแข็ง ด้วย still freezer ที่อุณหภูมิ -65 °C นาน 6 ชั่วโมง แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18±2 °C เป็นเวลานาน 5 วัน ก่อนนำมาผ่านขั้นตอนการละลายน้ำแข็ง โดยใช้วิธีการให้น้ำ (25-30 °C) ไหลผ่านตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติกที่ปิดผนึก จนกระทั่งอุณหภูมิกึ่งกลางเนื้อกุ้งเท่ากับ 0-2 °C หรือใช้เวลาประมาณ 20-25 นาที จากนั้นให้นำกุ้งก้ามกรามไปแช่เยือกแข็งซ้ำใหม่ กระทำซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ ดังแสดงในรูปที่ 3.1




หมายเหตุ * สุ่มตัวอย่างเนื้อกุ้งก้ามกรามขณะยังแช่เยือกแข็งมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงขนาดผลึกน้ำแข็ง

**รูปที่** 3.1 แผนภาพของการแช่เยือกแข็งและลายน้ำแข็งซ้ำของกุ้งก้ามกราม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางโครงสร้างกล้ามเนื้อ คุณภาพทางกายภาพ และทางชีวเคมีของกุ้งก้ามกราม ในระหว่างที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจานวน 5 ครั้ง ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.2.1-3.2.2.11

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely randomized design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย