บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	รูปแบบ (model)	บริษัทหรือหน่วยงานผู้ผลิต หรือประเทศผู้ผลิต
เครื่องวัดพีเอช	HI 8417	Hanna, West Germany
เครื่องชั่งไฟฟ้า	1518 MP8	Sartorius, West Germany
เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด	2462	Sartorius, West Germany
เครื่องเขย่า (rotary shaker)	Big Bill	Thermolyne, West Germany
เครื่องร่อนแยกขนาด	Vibro	Retsch, West Germany
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath)	CB 60	DT Hetotherm, Japan
เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Varifuge K	Haraeus Christ, West Germany
เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	UV-240	Shimadzu, Japan

อุปกรณ์	รุ่นแบบ (model)	บริษัทหรือหน่วยงานผู้ผลิต หรือประเทศผู้ผลิต
เครื่อง SEM (Scanning Electron Microscope)	JSM 35 CF	JEOL, Japan
เครื่องเคลือบทอง (fine coat)	Iron sputter model JEC-1100	JEOL, Japan
เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด	ประกอบขึ้นเองตามรูปที่ 3.2	ศูนย์บริการเครื่องมือ-ทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	MS/2	mgw Lauda
เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum dryer)	Auto Jack NAJ	Eyela, Japan
เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer)	SD-04	Lab Plant, England
เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer)	FD-1	Eyela, Japan
เครื่องย่อยโปรตีน	Kjeldatherm	Garhardt, West Germany
เครื่องกลั่นโปรตีน	Vapodest 1	Garhardt West Germany

อุปกรณ์	รุ่นแบบ (model)	บริษัทหรือหน่วยงานผู้ผลิต หรือประเทศผู้ผลิต
ตู้อบ (hot air oven)	E 53	WTB binder
เตาเผา (muffle furnace)	MEL 11-2	Carbolite
เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Amino Acid Analyzer)	KLA-3B	Hitashi, Japan

3.2 วัสดุและสารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส

L-tyrosine (Merck)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Fluka)

Hydrochloric acid (Merck)

Casein hammarsten (BDH)

Trichloroacetic acid (Merck)

วิธีเตรียม

3.2.1.1 เตรียมสารละลาย L-tyrosine ความเข้มข้น 100ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น จากนั้นเตรียมสารละลาย L-tyrosine ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางสารละลาย L-tyrosine ด้วยน้ำกลั่นเพื่อเป็นสารละลายมาตรฐาน

3.2.1.2 เตรียมสารละลายทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.1 ตามวิธีในภาคผนวก ก-4

3.2.1.3 เตรียมสารละลายเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.1 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดและคนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 สัปดาห์ เพื่อเป็นสับสเตรทของเอนไซม์

3.2.1.4 เตรียมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติคความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ในน้ำกลั่น เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และตกตะกอนโปรตีนขนาดใหญ่

3.2.2 <u>วัสดุและสารเคมีสำหรับตริงรูปโปรติเอสบนทราย</u>

ทรายแม่น้ำขนาด 35-50 เมช (รูปที่ 3.1)

Nitric acid (Merck)

ɣ-Aminopropyltriethoxysilane (APTS) (Sigma)

Neutrase® 0.5 L (Novo Industri A/S Copenhegen, Denmark)

Papain (Fluka)

รูปที่ 3.1 ทรายแม่น้ำขนาด 35-50 เมช

วิธีเตรียม

3.2.2.1 เตรียมทรายแม่น้ำขนาด 35-50 เมช โดยร่อนทรายผ่านตะแกรงขนาด 35-50 เมช จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำประปาหลาย ๆ รอบ จนหมดฝุ่นละออง อบแห้ง และแช่ในกรดไนตริคเข้มข้น 14 นอร์มัล ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท เพื่อเป็นตัวพยุงสำหรับปาเปนและนิวเตรส (Anprung และคณะ, 1989)

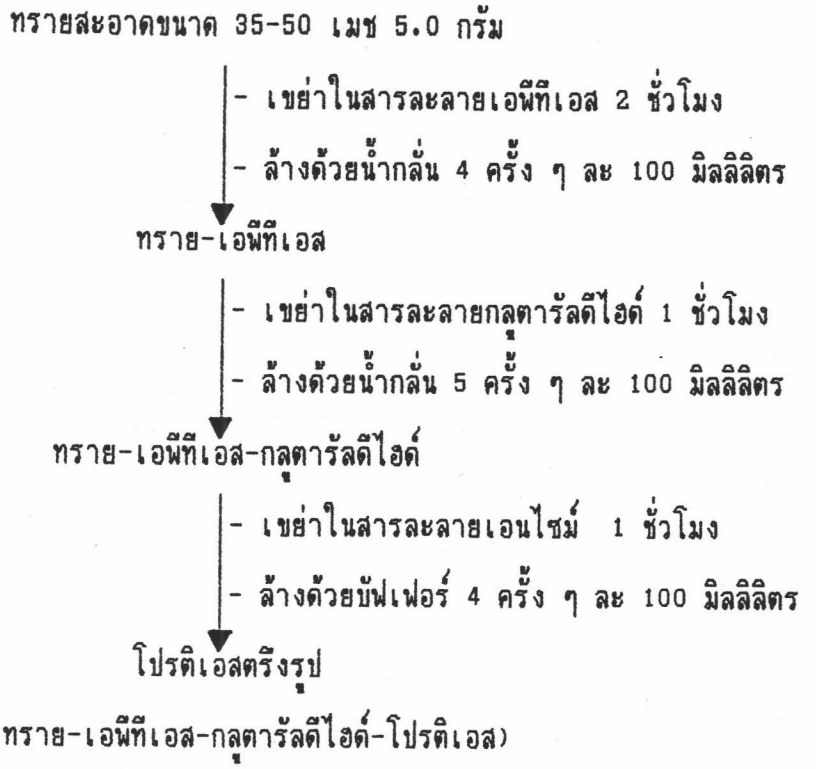
3.2.2.2 เตรียมสารละลายเอพีทีเอสความเข้มข้นร้อยละ 1-9 โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น เพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นตัวพยุงในการตริงรูป

3.2.2.3 เตรียมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 1-9 โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น เพื่อใช้สารสร้างพันธะร่วมในการตริงรูป

3.2.2.4 สารละลายปาเปน ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (1 กรัมของปาเปน มีแอคติวิตี 169,550 ยูนิต)

3.2.2.5 สารละลายนิวเตรส ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (1 มิลลิลิตรของนิวเตรสมีแอคติวิตี 172,410 ยูนิต)

3.2.2.6 เตรียมปาเปนและนิวเตรสตริงรูปบนทราย ตามแผนภูมิรูปที่ 3.2 (Anprung และคณะ, 1989)



รูปที่ 3.2 แผนภูมิขั้นตอนการเตรียมโปรติเอสตรึงรูปบนทราย

3.2.3 <u>สารเคมีสำหรับหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการตรึงรูป พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ และเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อพีเอช</u>

Sodium acetate trihydrate (Fluka)

Acetic acid (Merck)

Sodium dihydrogen phosphate (BDH)

Disodium dihydrogen phosphate (Merck)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Fluka)

Hydrochloric acid (Merck)

Disodiumtetraborate (Merck)

Sodium hydroxide (Carlo Erba)

วิธีเตรียม

3.2.3.1 สารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0-6.0

เตรียมตามวิธีในภาคผนวก ก-4

3.2.3.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0-7.0

เตรียมตามวิธีในภาคผนวก ก-4

3.2.3.3 สารละลายทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0-8.5

เตรียมตามวิธีในภาคผนวก ก-4

3.2.3.4 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0-10.0

เตรียมตามวิธีในภาคผนวก ก-4

3.2.4 สารเคมีสำหรับศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างการเก็บ

3.2.4.1 สารเคมีสำหรับศึกษาเสถียรภาพของปาเปนในระหว่างการเก็บ

Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)(Merck)

Cysteine (Merck)

วิธีเตรียม

3.2.4.1.1 สารละลายอีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ เพื่อเป็น chelating agent ในการจับอิออนของโลหะหนักไม่ให้ไปจับกับหมู่ไธออล (thiol group) ที่สำคัญของปาเปน

3.2.4.1.2 สารละลายซีสเตอีน ความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ เพื่อทำหน้าที่เป็น reducing agent

3.2.4.2 สารเคมีสำหรับศึกษาเสถียรภาพของนิวเตรสในระหว่างการเก็บ

Calcium sulphate (Hopkin & Williams)

วิธีเตรียม

เตรียมสารละลายแคลเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 2×10^{-3} โมลาร์ เพื่อรักษาเสถียรภาพของนิวเตรส

3.2.5 <u>วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษาการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์โปรติเอสตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด</u>

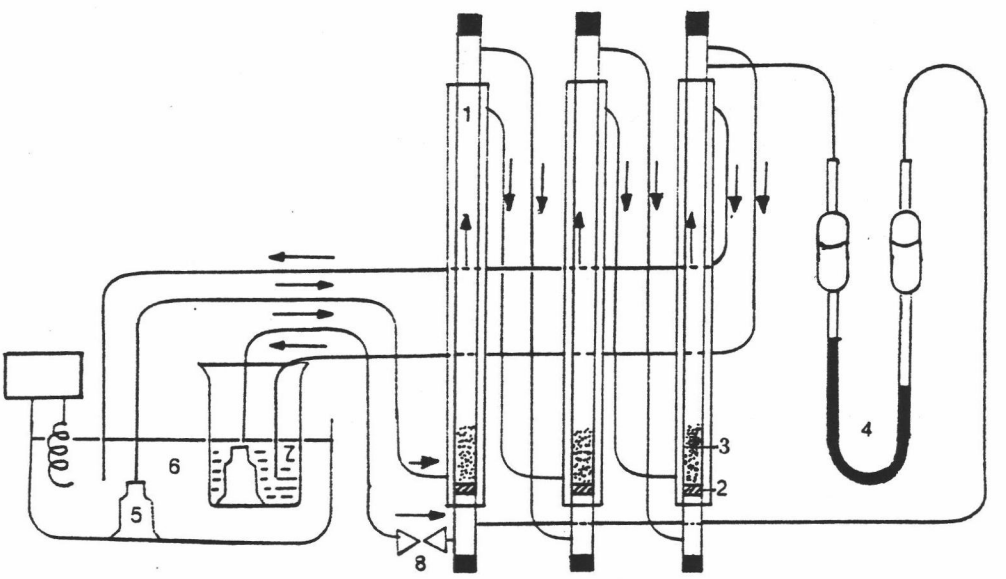
น้ำนึ่งปลาทูน่าพันธุ์ Skipjack จากโรงงาน ยูนิคอร์ด (ประเทศไทย) จำกัด

เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด

<u>วิธีเตรียม</u>

3.2.5.1 เตรียมน้ำนึ่งปลาทูน่าพันธุ์ Skipjack ซึ่งแช่แข็งในถังเหล็กขนาด 20 ลิตร จากโรงงานยูนิคอร์ด (ประเทศไทย) จำกัด นำมาละลายและแบ่งใส่ถุงพลาสติกถุงละ 2000 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง นำมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส

3.2.5.2 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโปรติเอสตรึงรูป เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการทดลองเป็นแบบ Fluidized Bed Reactor ขนาด 1.7 x 75 เซนติเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน x ความยาว) ต่อกันจำนวน 3 คอลัมน์ ประกอบด้วยคอลัมน์พลาสติกใสสองชั้น ชั้นนอกสำหรับควบคุมอุณหภูมิโดยใช้การไหลเวียนของน้ำ ชั้นในสำหรับบรรจุเอนไซม์โปรติเอสตรึงรูป อุปกรณ์อื่น ๆ ที่ใช้ร่วมกันคือ เครื่องสูบขนาดเล็ก (pump) สายยาง วาล์วควบคุมอัตราการไหล หม้อแปลงไฟฟ้ากระแสสลับ และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ระบบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและการจัดชุดอุปกรณ์แสดงดังแผนภาพรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แผนภาพเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบดพร้อมชุดอุปกรณ์

1. เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด
2. แผ่นกระจายตัว (distributor)
3. เอนไซม์ตริงรูป
4. มานอมิเตอร์
5. เครื่องสูบขนาดเล็ก
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
7. น้ำนึ่งปลา
8. วาล์วเปิด-ปิด

3.2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน

Coomassie Brilliant Blue G250 (CBBG 250) (Fluka)

Bovine Serum Albumin (BSA) (Fluka)

Ethyl alcohol 95 % (Merck)

Phosphoric acid 85 % (Carlo Erba)

วิธีเตรียม

3.2.6.1 เตรียมสารละลาย coomassie โดยชั่ง CBBG 250 หนัก 100 มิลลิกรัม ละลายในเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 50 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด เติมกรดฟอสฟอริคความเข้มข้นร้อยละ 85 จำนวน 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.2.6.2 เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin โดยชั่ง BSA หนัก 0.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ได้สารละลาย BSA ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปิเปต BSA ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 จำนวน 400 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนเป็น 10 มิลลิลิตร ได้สารละลาย BSA ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 เพื่อเป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Sedmak และคณะ, 1977)

3.2.7 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

Copper sulphate (Merck)

Potassium sulphate (Merck)

Sulfuric acid (Merck)

Sodium hydroxide (Merck)

Boric acid (Merck)

Methyl red (Merck)

วิธีเตรียม

3.2.7.1 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3.2.7.2 เตรียมสารละลายกรดบอริคความเข้มข้นร้อยละ 4.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยละลายกรดบอริคในน้ำกลั่น ให้ความร้อนและคนตลอดเวลาจนละลายหมด โดยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า ทำเป็นปริมาตรที่ต้องการด้วยน้ำกลั่น

3.2.7.3 เตรียมเมธิลเรด ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อ 100 ลูกบาศก์-เซนติเมตรในเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 60

3.2.8 <u>สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ไขมัน</u>

Petroleum ether (Baker Analyzed)

3.2.9 <u>สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โซเดียมคลอไรด์</u>

Sodium chloride (Univar)

Potassium chromate (BDH)

Potassium dichromate (Carlo Erba)

Silver nitrate (Fluka)

Potassium thiocyanate (Riedel-De Haen Ag Seelze-Hannover)

Ferric alum (May & Baker)

Nitric acid (Merck)

<u>วิธีเตรียม</u>

3.2.9.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับ 0.1 ฟอร์มัล โดยนำโซเดียมคลอไรด์ที่เป็นรีเอเจนต์เกรด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในตู้อบเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งโซเดียมคลอไรด์ที่ได้ให้มีน้ำหนักใกล้เคียงกับ 0.58 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในขวดวัดปริมาตร

3.2.9.2 เตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์ โดยละลายโปแตสเซียมโครเมต 4.2 กรัม และโปแตสเซียมไดโครเมต 0.7 กรัม ในน้ำกลั่น และเจือจางจนได้ปริมาตรของสารละลายเป็น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้สารละลายนี้ 1-2 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อสาร

ละลายที่จุดยุติ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.2.9.3 เตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต โดยละลายซิลเวอร์ไนเตรต 8.5 กรัม ในน้ำกลั่น 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บสารละลายนี้ในขวดสีชา

3.2.9.4 สารละลายโปแตสเซียมไธโอไซยาเนต ความเข้มข้น 0.1 ฟอร์มัล โดยละลายโปแตสเซียมไธโอไซยาเนต 2.5 กรัม ในน้ำกลั่น 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.2.9.5 เตรียมสารละลายเฟอร์ริคอะลัม ความเข้มข้น 40 กรัมต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยละลายเฟอร์ริคอะลัม 40 กรัม ในน้ำกลั่น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วหยดกรดไนตริคความเข้มข้น 0.6 ฟอร์มัล 2-3 หยด ลงไปในสารละลายที่ได้ (ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์, 2528)

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตริงรูปปาเปนและนิวเตรสบนทราย

3.3.1.1 ศึกษาความเร็วรอบของเครื่องเขย่า และเวลาที่เหมาะสมในการตริงรูป

เตรียมนิวเตรสตริงรูป ตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยแปรความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 4 ระดับคือ 100, 200, 300 และ 400 รอบ/นาที และแปรเวลาที่ใช้ในการตริงรูป 4 ระดับคือ 30, 60, 90 และ 120 นาที วางแผนการทดลองแบบ factorial completely ramdomized design ขนาด 4x4 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูป ตามวิธีในภาคผนวก ก-1 วิเคราะห์ข้อมูลด้วย Anova และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.3.1.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเอนีทีเอส และกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการตริงรูป

เตรียมปาเปนและนิวเตรสตริงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1 แปรความเข้มข้นของสารละลายเอนีทีเอส 6 ระดับคือ ร้อยละ 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 โดยปริมาตร และกลูตารัลดีไฮด์ 6 ระดับคือ

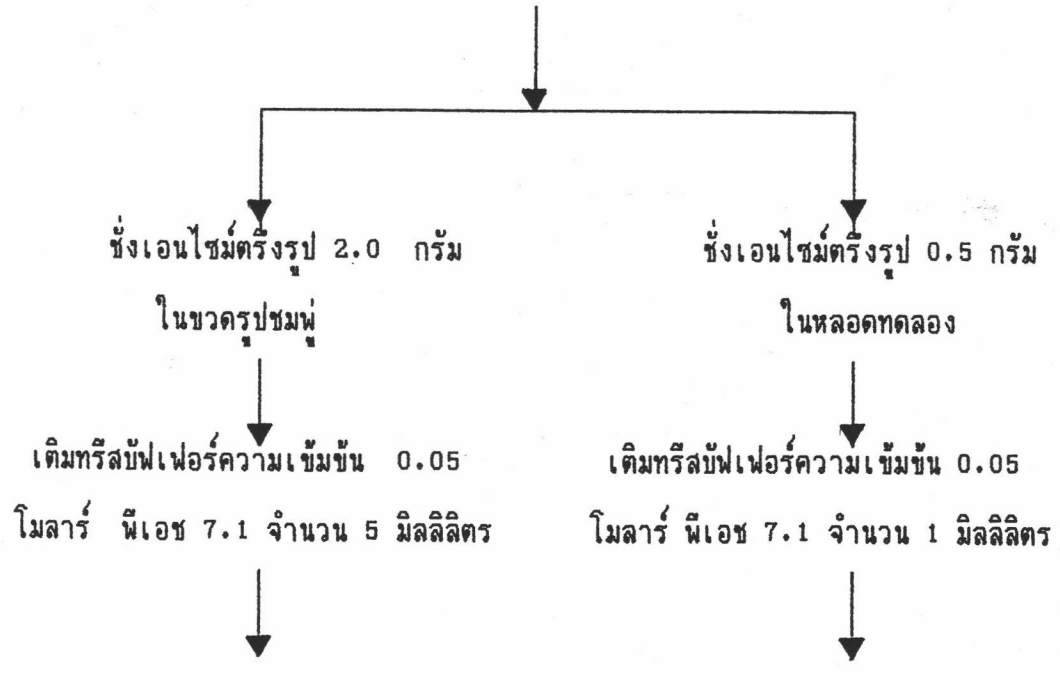
ร้อยละ 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 โดยปริมาตร วางแผนการทดลองแบบ factorial comptetely randomized design ขนาด 6x6 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป ตามวิธีในภาคผนวก ก-1 วิเคราะห์ข้อมูลด้วย Anova และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

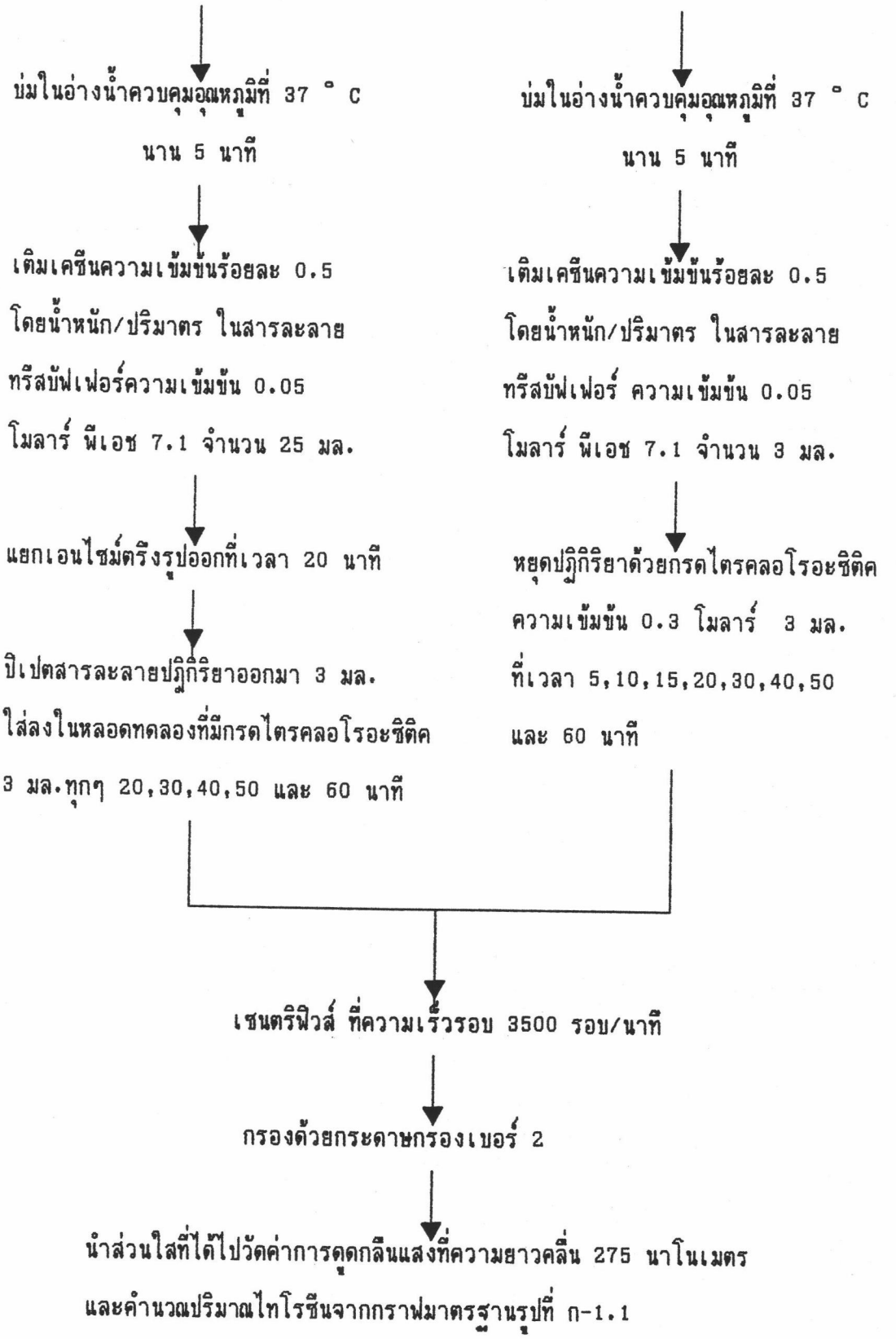
พิจารณาภาวะที่เหมาะสมโดยเลือกความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ ที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงที่สุด ถ้าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จะต้องนำมาทดสอบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของเอนไซม์บนตัวพยุง ดังวิธีในข้อ 3.3.1.3

3.3.1.3 <u>เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของโปรติเอสตรึงรูปบนทราย</u>

ทดสอบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของโปรติเอสตรึงรูปบนทรายตามแผนภูมิรูปที่ 3.4

เตรียมโปรติเอสตรึงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.1.2





รูปที่ 3.4 แผนภูมิการทดสอบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของโปรติเอสตริงรูปบนทราย

พิจารณาปริมาณไทโรซีนต่อเวลาที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนด้วยเอนไซม์อิสระที่หลุดออกจากตัวพยุงหลังจากแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกที่เวลา 20 นาที เลือกภาวะการตรึงรูปที่ทำให้ปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นต่อเวลาต่ำที่สุด เป็นภาวะที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3.1.4 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการตรึงรูป

เตรียมป่าเปนและนิวเตรสตรึงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.3 แปรพีเอชของสารละลายเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ กัน ดังนี้คือ อะซีเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 และ 7.0 ทรีสบัฟเฟอร์พีเอช 7.1, 8.0 และ 8.5 และ บอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 9.0, 9.5 และ 10.0 วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ตามวิธีในภาคผนวก ก-1

3.3.1.5 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

เตรียมป่าเปนและนิวเตรสตรึงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1 - 3.3.1.4 แปรความเข้มข้นของสารละลายป่าเปน (169,550 ยูนิต/กรัม) ร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร และสารละลายนิวเตรส (172,410 ยูนิต/มิลลิลิตร) ร้อยละ 1, 3, 5 และ 8 โดยปริมาตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปตามวิธีในภาคผนวก ก-1 วิเคราะห์ข้อมูลด้วย Anova และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.3.2 ศึกษาโครงสร้างของป่าเปนและนิวเตรสตรึงรูปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของทรายสะอาดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน

3.3.2.1 ศึกษาโครงสร้างของทรายสะอาดที่พร้อมสำหรับการตรึงรูป

เคลือบทองทรายสะอาดด้วยเครื่อง Fine Coat แบบ Ion sputter model JEC-1100 ของ JEOL นาน 5 นาที และตรวจดูโครงสร้างด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 300 และ 5,000 เท่า

3.3.2.2 ศึกษาโครงสร้างของป่าเปนและนิวเตรสตริงรูปบนทราย

แช่เอนไซม์ตริงรูปจำนวน 1.0 กรัม ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร นาน 3 ชั่วโมง และเทสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ออก นำไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 50, 70 และ 95 โดยปริมาตร ความเข้มข้นละ 15 นาที ตามลำดับ อบเอนไซม์ตริงรูปให้แห้งสนิท นำไปเคลือบทองด้วยเครื่อง Fine coat แบบ Ion sputter model JEC-1100 ของ JEOL นาน 5 นาที ตรวจดูโครงสร้างด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

3.3.3 ศึกษาสมบัติเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของป่าเปนและนิวเตรสตริงรูปเทียบกับป่าเปนและนิวเตรสอิสระ

3.3.3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

เตรียมป่าเปนและนิวเตรสตริงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.5 หลอดละ 0.5 กรัม และเตรียมสารละลายป่าเปนและนิวเตรสอิสระความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และร้อยละ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปและอิสระตามวิธีในภาคผนวก ก-1 โดยบ่มเอนไซม์กับสารละลายเคซีนที่อุณหภูมิ 30-100 องศาเซลเซียส

3.3.3.2 พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

เตรียมป่าเปนและนิวเตรสตริงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.5 หลอดละ 0.5 กรัม และเตรียมสารละลายป่าเปนและนิวเตรสอิสระความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และร้อยละ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอชต่าง ๆ ดังนี้ อะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0-6.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0-7.0 ทริสบัฟเฟอร์พีเอช 7.1-8.5 หลอดละ 1.6 มิลลิลิตร วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปและอิสระตามวิธีในภาคผนวก ก-1 โดยบ่มเอนไซม์กับสารละลายเคซีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.625 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร จำนวน 2.4 มิลลิลิตร

หมายเหตุ เตรียมสารละลายเคซีนเข้มข้นร้อยละ 0.625 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยละลายเคซีน 1.25 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 นอร์มัล 1 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายเคซีนให้เป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.3.3.3 ผลของความร้อนต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

เตรียมปาเปนและนิวเตรสตริงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.5 หลอดละ 0.5 กรัม และเตรียมสารละลายปาเปนและนิวเตรสอิสระความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และร้อยละ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.1 หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 และ 70 องศาเซลเซียส ดึงหลอดทดลองออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิและแช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีที่เวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปและอิสระตามวิธีในภาคผนวก ก-1

3.3.3.4 ผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

เตรียมปาเปนและนิวเตรสตริงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.5 หลอดละ 0.5 กรัม และเตรียมสารละลายปาเปนและนิวเตรสอิสระความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และร้อยละ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอชต่าง ๆ ดังนี้คือ อะซีเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 และ 6.0 ทริสบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และ 8.5 หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปและอิสระที่เวลา 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ตามวิธีในภาคผนวก ก-1

3.3.3.5 ศึกษาค่าคงที่ไมคีลิส (Michaelis Constant, Km)

เตรียมปาเปนและนิวเตรสตริงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.5 หลอดละ 0.5 กรัม และเตรียมสารละลายปาเปนและนิวเตรสอิสระความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และร้อยละ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.3.2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปและอิสระตามวิธีในภาคผนวก ก-1 โดยแปรความเข้มข้นของสารละลายเคซีนความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้คือ ร้อยละ 0.0375, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.3.1

หมายเหตุ น้ำหนักโมเลกุลของเคซีนเท่ากับ 375,000

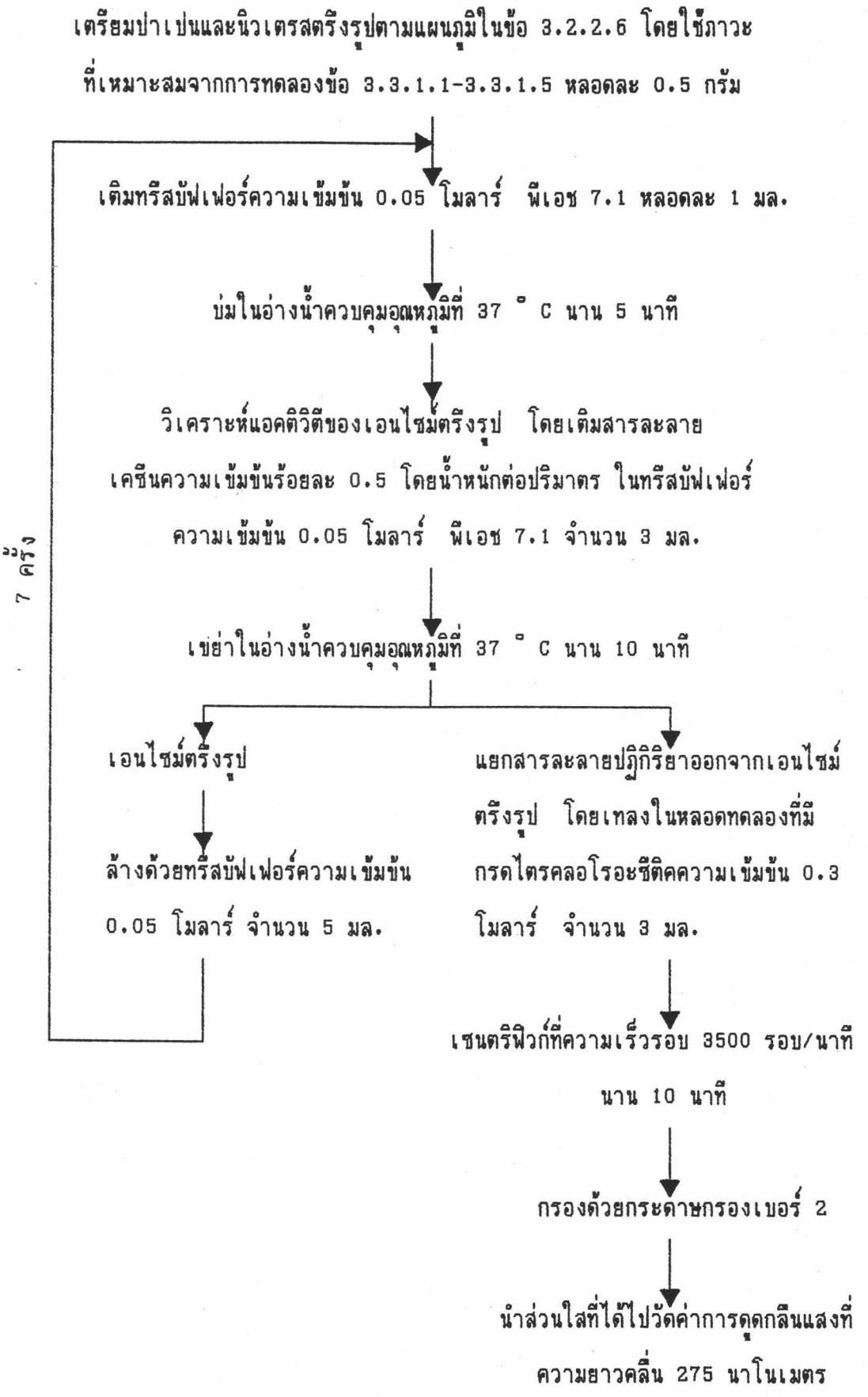
3.3.3.6 แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (Specific activity)

เตรียมปาเปนและนิวเตรสตริงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.5 หลอดละ 0.5 กรัม และเตรียมสารละลายปาเปนและนิวเตรสอิสระความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และร้อยละ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.3.1 และ 3.3.3.2 ตามลำดับ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตริงรูปและอิสระด้วยวิธี Semi Micro Kjeldhal Distillation (AOAC, 1980) คำนวณแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ดังนี้

$$\text{แอคติวิตีจำเพาะ} = \frac{\text{แอคติวิตีของเอนไซม์ (ยูนิต)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)}}$$

3.3.4 ศึกษาประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาซ้ำของปาเปนและนิวเตรสตริงรูป

ทดสอบประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาซ้ำของปาเปนและนิวเตรสตริงรูปตามแผนภูมิรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 แผนภูมิการทดสอบประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาซ้ำของโปรติเอสตริงรูป

3.3.5 ศึกษาผลของสารปฏิกิริยาต่อเสถียรภาพของปาเปนและนิวเตรสตริงรูป

3.3.5.1 ศึกษาผลของอีดีทีเอและซีสเตอีนต่อเสถียรภาพของปาเปนตริงรูป

เตรียมปาเปนตริงรูป ตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.5 จำนวน 5.0 กรัม นำไปเก็บที่ภาวะต่าง ๆ 3 ภาวะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนี้

(1) เก็บในสารละลายอีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ และซีสเตอีนความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ ในน้ำกลั่น จำนวน 100 มิลลิลิตร

(2) เก็บในสารละลายอีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ และซีสเตอีนความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ ในบัฟเฟอร์ที่ปาเปนตริงรูปมีเสถียรภาพดีที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.3.4 เป็นตัวทำละลาย จำนวน 100 มิลลิลิตร

(3) เก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปาเปนตริงรูปมีเสถียรภาพดีที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.3.4 จำนวน 100 มิลลิลิตร

3.3.5.2 ศึกษาผลของแคลเซียมอิออนต่อเสถียรภาพของนิวเตรสตริงรูป

เตรียมนิวเตรสตริงรูป ตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.5 จำนวน 5.0 กรัม นำไปเก็บในภาวะต่าง ๆ 3 ภาวะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนี้

(1) เก็บในสารละลายแคลเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น $2x10^{-3}$ โมลาร์ ในน้ำกลั่น จำนวน 100 มิลลิลิตร

(2) เก็บในสารละลายแคลเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น $2x10^{-3}$ โมลาร์ ในบัฟเฟอร์ที่นิวเตรสตริงรูปมีเสถียรภาพดีที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.3.4 เป็นตัวทำละลาย จำนวน 100 มิลลิลิตร

(3) เก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิวเตรสตริงรูปมีเสถียรภาพดีที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.3.4 จำนวน 100 มิลลิลิตร

3.3.6 เสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปในระหว่างการเก็บ

เตรียมป่าเปนและนิวเตรสตรึงรูปตามวิธี 3.2.2.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.1.1-3.3.1.5 จำนวน 15.0 กรัม นำไปเก็บในภาวะที่เอนไซม์มีเสถียรภาพในระหว่างการเก็บดีที่สุด ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.5 ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส) วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 1, 3, 4, 8, 16, 24, 32 และ 65 วัน

3.3.7 ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโปรติเอสตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

3.3.7.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิและจำนวนรอบต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา

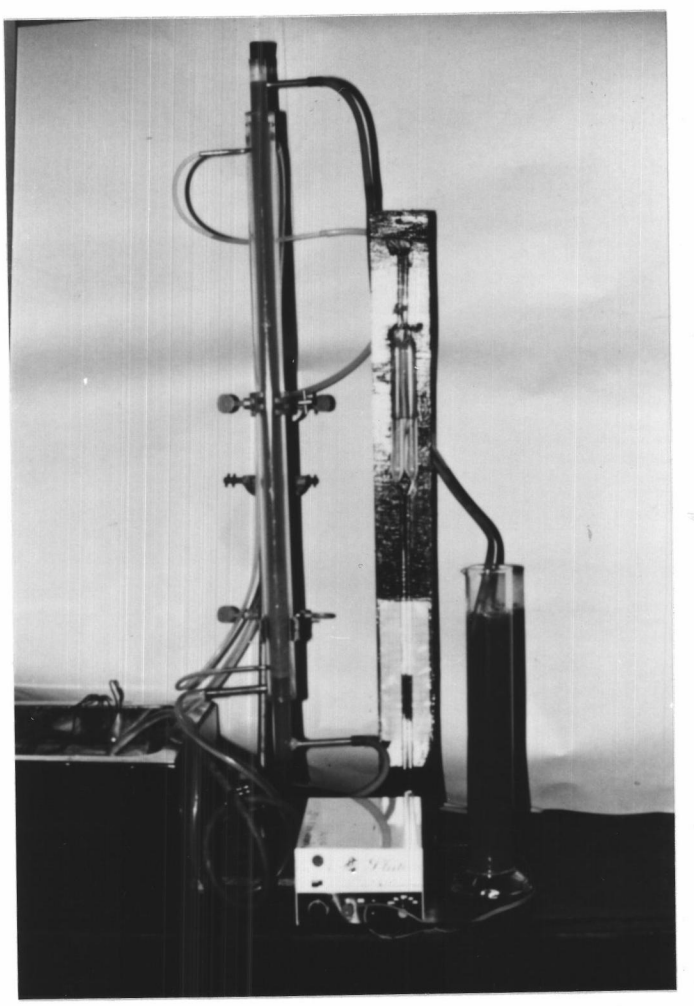
3.3.7.1.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

นำทรายจำนวน 15.0 กรัม บรรจุลงในเครื่องปฏิกรณ์ ขนาด 1.7x75 เซนติเมตร จำนวน 1 คอลัมน์ เปิดวาล์วควบคุมอัตราการไหลของน้ำนึ่งปลา โดยให้ทรายเกิดฟลูอิไดเซชั่นอย่างแรง จากนั้นลดอัตราการไหลลงจนทรายอยู่ในลักษณะเบดนิ่ง เริ่มแปรอัตราการไหลขาออกของน้ำนึ่งปลา บันทึกค่าความดันตกทุก ๆ อัตราการไหล สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความดันตกและอัตราการไหลของน้ำนึ่งปลาที่อุณหภูมิ 35 และ 50 องศาเซลเซียส เพื่อหาอัตราการไหลต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.3.7.1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและจำนวนรอบต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา

นำเอนไซม์ตรึงรูปบนทรายจำนวน 15.0 กรัม บรรจุลงในเครื่องปฏิกรณ์ เปิดวาล์วควบคุมอัตราการไหลของน้ำนึ่งปลาจนเกิดลักษณะฟลูอิไดเซชั่นอย่างแรง จากนั้นลดอัตราการไหลของน้ำนึ่งปลาลงจนถึงอัตราการไหลเป็น 150 มิลลิลิตร/นาที (1.5 เท่าของความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่นที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.7.1.1) คิดเป็นค่า SV (Space velocity) ซึ่งหมายถึง สัดส่วนระหว่างอัตราเร็วการไหลต่อปริมาตรของเอนไซม์ตรึงรูปในคอลัมน์เป็น 13.2 (นาที)$^{-1}$ กำหนดปริมาณน้ำนึ่งปลาที่ใช้ในการทดลอง

เป็น 4,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำนึ่งปลาที่ได้จากการย่อยสลายในรอบแรก ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ซ้ำในรอบที่ 2 และ 3 โดยใช้อัตราการไหลเท่าเดิม เก็บสารสกัดจากปลารวมที่ได้จากการย่อยสลายในแต่ละรอบ ที่อุณหภูมิ 35 และ 50 องศาเซลเซียส วัดระดับการย่อยสลายโปรตีนของสารสกัดจากปลารวมที่ได้จากการย่อยสลายในแต่ละรอบตามวิธีในภาคผนวก ก-2 การจัดชุดอุปกรณ์สำหรับการทดลองนี้แสดงดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดขนาด 1.7x75 เซนติเมตร จำนวน 1 คอลัมน์ พร้อมชุดอุปกรณ์ประกอบ

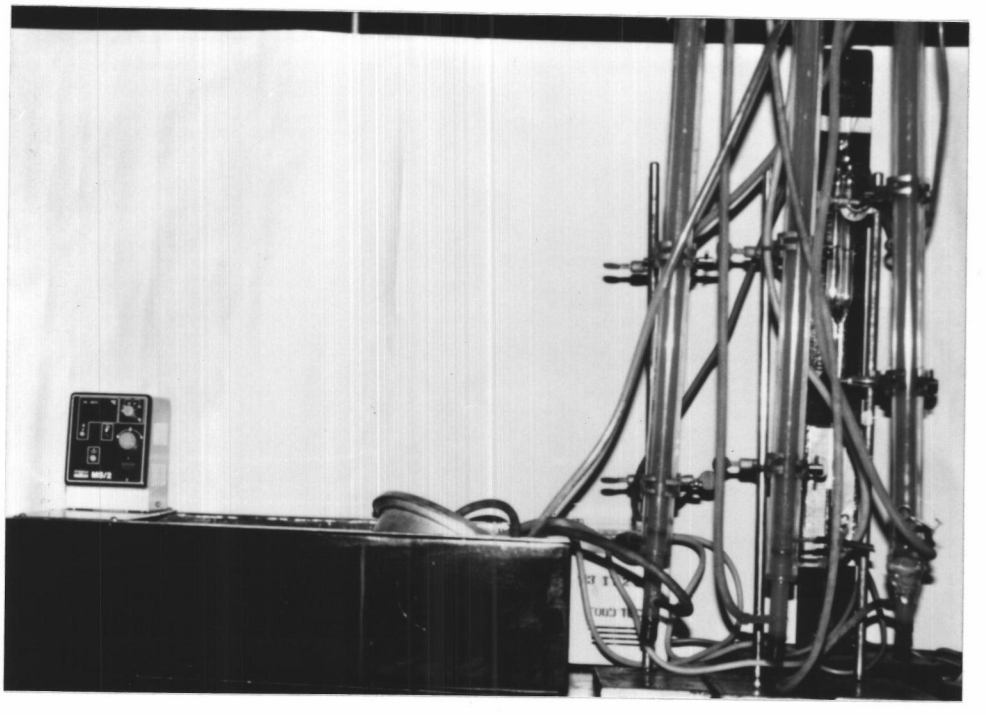
3.3.7.2 <u>ศึกษาผลของปริมาณปาเปนและนิวเตรสตริงรูปต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา</u>

3.3.7.2.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

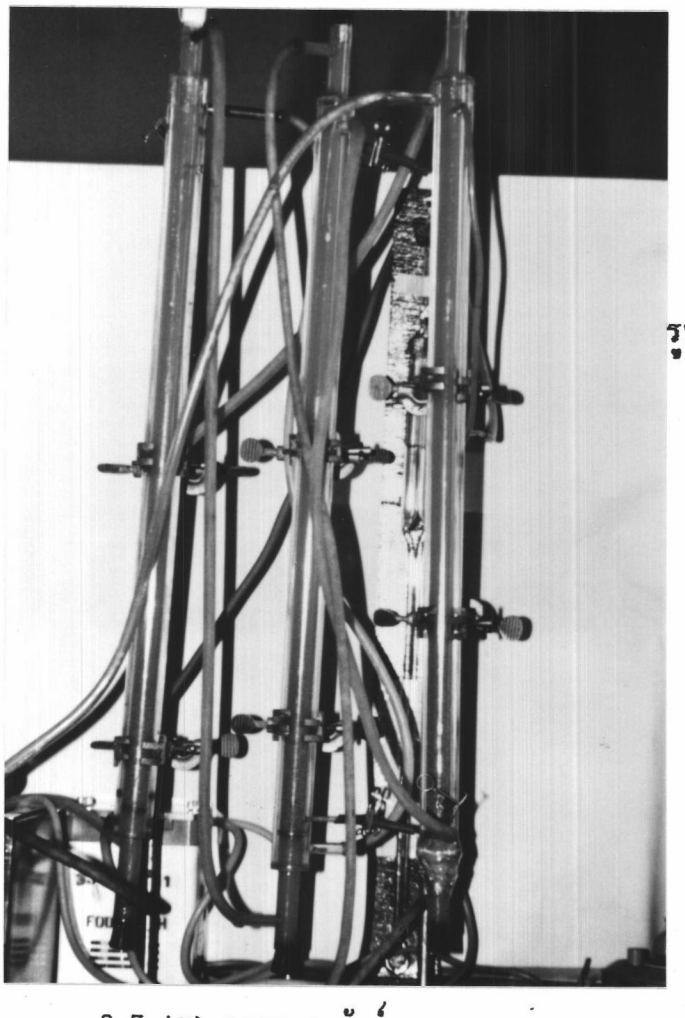
หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่นเมื่อใช้ทรายจำนวน 10, 15 และ 25 กรัม โดยบรรจุลงในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 1.7x75 เซนติเมตร จำนวน 3 คอลัมน์ ต่อเนื่องกัน (บรรจุทรายปริมาณเท่ากันในแต่ละคอลัมน์) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.7.1.1

3.3.7.2.2 ศึกษาผลของปริมาณปาเปนและนิวเตรสตริงรูปต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา

แปรปริมาณเอนไซม์ตริงรูปบนทรายจำนวน 10, 15 และ 25 กรัม บรรจุลงในเครื่องปฏิกรณ์จำนวน 3 คอลัมน์ (บรรจุเอนไซม์ตริงรูปปริมาณเท่ากันในแต่ละคอลัมน์) เปิดวาล์วควบคุมอัตราการไหลของน้ำนึ่งปลาจนเกิดฟลูอิไดเซชั่นอย่างแรง จากนั้นลดอัตราการไหลลงจนเป็น 225, 270 และ 300 มิลลิลิตร/นาที (1.5 เท่าของความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่นที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.7.2.1) คิดเป็นค่า SV (Space velocity) ซึ่งหมายถึง สัดส่วนระหว่างอัตราเร็วการไหลต่อปริมาตรของเอนไซม์ตริงรูปในคอลัมน์เป็น 11.0, 7.9 และ 5.5 (นาที)$^{-1}$ ตามลำดับ กำหนดปริมาณน้ำนึ่งปลาที่ใช้ในการทดลองเป็น 1000 มิลลิลิตร ไหลวนเวียนภายในเครื่องปฏิกรณ์เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส วัดอัตราการย่อยสลายโปรตีนทุกชั่วโมงตามวิธีในภาคผนวก ก-2 การจัดชุดอุปกรณ์สำหรับการทดลองนี้แสดงดังรูปที่ 3.7



3.7 (ก) ระบบรวม



3.7 (ข) เฉพาะคอลัมน์

รูปที่ 3.7 เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด
ขนาด 1.7x75 เซนติเมตร
ต่อเนื่องกันจำนวน 3 คอลัมน์
พร้อมชุดอุปกรณ์ประกอบ

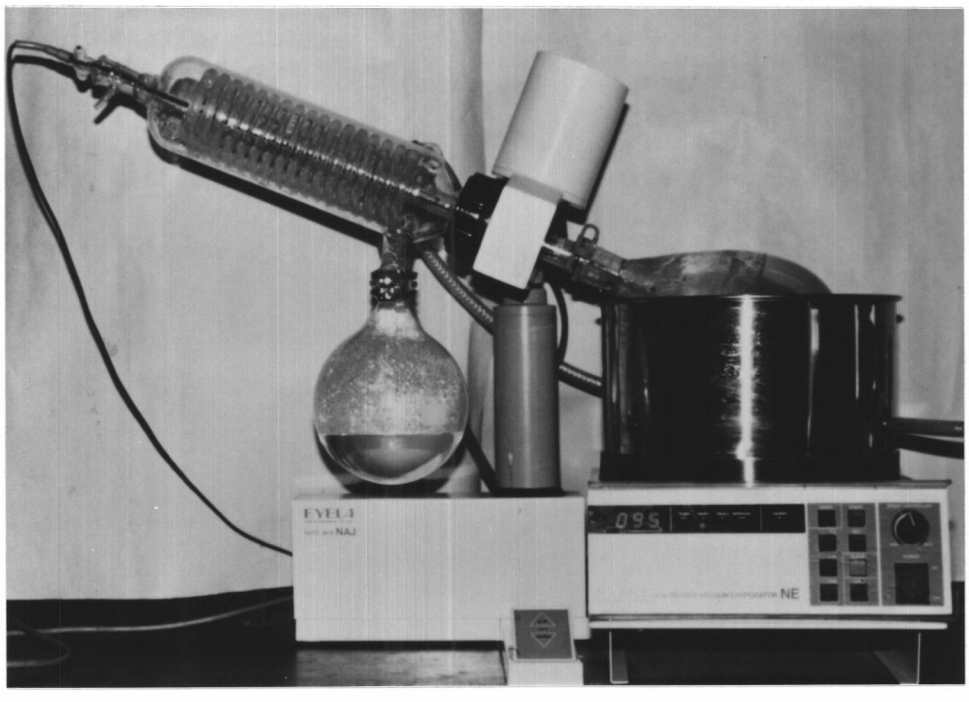
3.3.8 การเตรียมและศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากปลาแบบแห้งและแบบเข้มข้น

3.3.8.1 การเตรียมและศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากปลา

นำสารสกัดจากปลาที่ได้จากการนำน้ำนึ่งปลาพันธุ์ skipjack จากบริษัท ยูนิคอร์ด (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งผ่านการย่อยสลายอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องปฏิกรณ์ปาเป่นและนิวเตรสตริงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดขนาด 1.7x75 เซนติเมตร จำนวน 3 คอลัมน์ ต่อเนื่องกันภายใต้ภาวะการผลิตที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.7 นำสารสกัดจากปลาดังกล่าวมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเกลือ ตามวิธี AOAC (1980) ดังแสดงในภาคผนวก ข-1 และตรวจสอบชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระโดยใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน เปรียบเทียบกับน้ำนึ่งปลาเริ่มต้น

3.3.8.2 การเตรียมและศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากปลาเข้มข้น

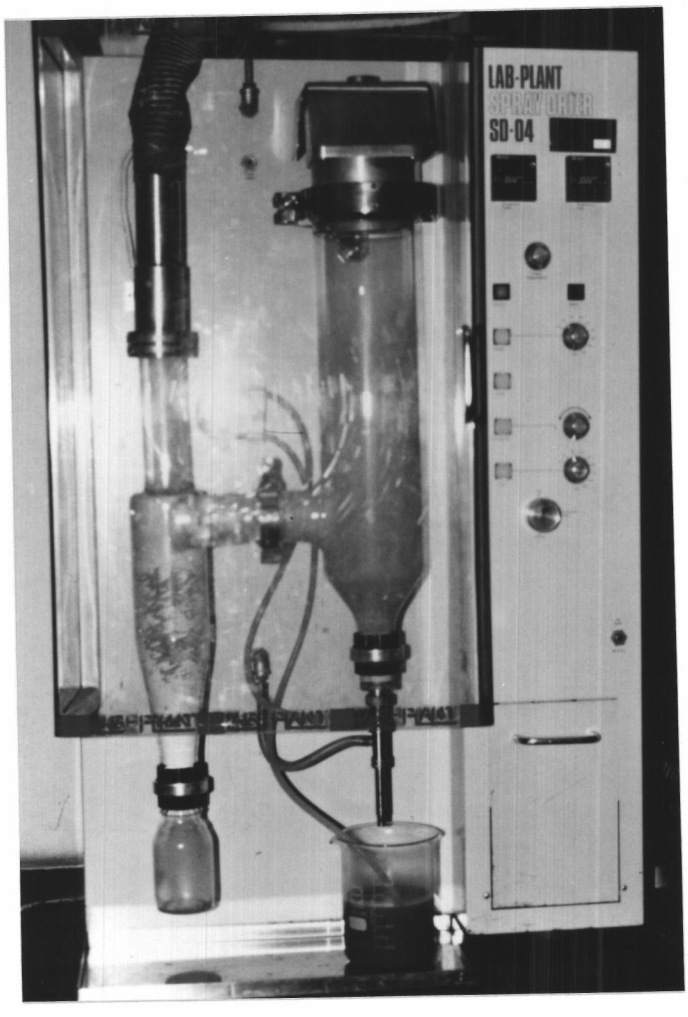
นำสารสกัดจากปลาที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเครื่องปฏิกรณ์ปาเป่นและนิวเตรสตริงรูปจำนวน 500 มิลลิลิตร มาระเหยน้ำภายใต้ความดัน 13.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 240 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเกลือ ตามวิธี AOAC (1980) ดังแสดงในภาคผนวก ข-1 การทำเข้มข้นภายใต้ภาวะสุญญากาศแสดงดังรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 การทำเข้มข้นสารสกัดจากปลาภายใต้ภาวะสุญญากาศ

3.3.8.3 <u>การเตรียมและศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากปลาแบบผงแห้ง</u>

นำสารสกัดจากปลาที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเครื่องปฏิกรณ์ปาเปนและนิวเตรสตริงรูปจำนวน 1000 มิลลิลิตร มาทำแห้งด้วยวิธีการพ่นฝอย ภาวะที่ใช้คือ อุณหภูมิลมเข้า 200 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมออก 90 องศาเซลเซียส ความดันลม 30 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อัตราการป้อน 350 มิลลิลิตร/ชั่วโมง และทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งภายใต้ความดัน 0.1 มิลลิเมตรของปรอท อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเกลือ ตามวิธี AOAC (1980) ดังแสดงในภาคผนวก ข-1 และดัชนีการละลาย (Nitrogen Solubility Index) ตามวิธีของ Quarglia และ Orban (1986) ดังแสดงในภาคผนวก ข-2 การทำแห้งสารสกัดจากปลาด้วยวิธีการพ่นฝอยและแช่เยือกแข็ง แสดงดังรูปที่ 3.9 และ 3.10 ตามลำดับ



รูปที่ 3.9 การทำแห้งสารสกัดจากปลาด้วยวิธีพ่นฝอย

รูปที่ 3.10 การทำแห้งสารสกัดจากปลาด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง

3.3.9 การใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากปลาเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร

3.3.9.1 การใช้สารสกัดจากปลาแบบเข้มข้นในผลิตภัณฑ์บาบิคิวไก่ (ยาคิโทริ)

ทดลองใช้สารสกัดจากปลาเข้มข้นเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสปลาย่างในผลิตภัณฑ์ยาคิโทริโดยประกอบในส่วนผสมดังนี้

สูตรผลิตภัณฑ์ยาคิโทริ (สูตรจากพ่อครัวที่มีประสบการณ์ในการทำยาคิโทริ)

ขั้นตอนการหมักไก่

ส่วนผสม	สะโพกไก่	1500	กรัม
	น้ำมันพืช	20	ลูกบาศก์เซนติเมตร
	Teriyaki Marinade	30	ลูกบาศก์เซนติเมตร
	เกลือ	1	กรัม

วิธีทำ นำส่วนผสมทั้งหมดคลุกให้เข้ากัน นำมาเสียบไม้สลับกับกระเจี๊ยบขาว พริกหวานและถั่วแขก หมักทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนการเตรียมน้ำปรุงรส

ส่วนผสม	น้ำ	700	ลูกบาศก์เซนติเมตร
	ซุปไก่คะนอ	15	กรัม
	กระดูกไก่	200	กรัม
	Teriyaki Marinade	30	ลูกบาศก์เซนติเมตร
	แป้งมัน	3	กรัม

วิธีทำ ต้มน้ำจนเดือด เติมกระดูกไก่ ซุปไก่คะนอ และ Teriyaki Marinade เคี่ยวน้ำจนงวดลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง แบ่งส่วนผสมออกเป็น 3 ส่วน ๆ ละ 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนที่ 1 ไม่เติมสารปรุงแต่งกลิ่นรสใด ๆ ส่วนที่ 2 และส่วนที่ 3 เติมสารสกัดจากปลาเข้มข้นที่ได้จากการย่อยสลายด้วยปาเปนและนิวเตรสตริงรูปส่วนละ 8 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปต้มอีกครั้งจนเดือดนำไก่เสียบไม้ที่ได้จากขั้นตอนการหมักไก่มาย่างพอสุกปานกลาง ใช้แปรงจุ่มน้ำปรุงรสที่ได้ในแต่ละส่วนมาทาไก่หมัก ย่างและทาซ้ำจำนวน 3 ครั้ง นำไปประเมินผลทางประสาทสัมผัส โดยพิจารณากลิ่นรสปลาย่าง ใช้วิธีทดสอบแบบ scoring

มีระดับคะแนนตั้งแต่ 0-9 คะแนน โดย 9 คะแนน หมายถึง มีกลิ่นรสปลาย่างมากที่สุด และ 0 หมายถึง ไม่มีกลิ่นรสปลาย่าง และประเมินระดับการยอมรับของผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยวิธีทดสอบแบบ 9-point hedonic scale โดย 9 คะแนน หมายถึง ชอบมากที่สุด และ 1 คะแนน หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด ในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้เติมสารปรุงแต่งกลิ่นรสเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เติมสารสกัดจากปลาเข้มข้นที่ได้จากการย่อยสลายด้วยปาเปนและนิวเตรสตริงรูป ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 12 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติด้วยวิธี Randomized Complete Blocks Design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test แบบทดสอบแสดงดังภาคผนวก ก-3.1

3.3.9.2 <u>การใช้ผงแห้งจากสารสกัดจากปลาในผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปรสซุปปลา</u>

ทดลองใช้ผงแห้งจากสารสกัดจากปลาที่ได้จากการย่อยสลายด้วยปาเปนและนิวเตรสตริงรูปซึ่งผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการพ่นฝอยและแช่เยือกแข็งในผลิตภัณฑ์ในเครื่องปรุงบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปรสซุปปลา ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

<u>สูตรเครื่องปรุงบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปรสซุปปลา</u>

(ดัดแปลงจากสูตรเครื่องปรุงบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปรสไก่ของ Nair และ Sivetz, 1973)

ส่วนผสม	น้ำตาล	4.8	กรัม
	เกลือ	4.8	กรัม
	น้ำมันพืช	1.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร
	ผงแห้งจากสารสกัดจากปลา	0.75	กรัม
	ผงกระเทียม	0.35	กรัม
	พริกไทย	0.35	กรัม
	พริกแดงป่น	0.25	กรัม
	ใบหอมแห้ง	0.05	กรัม

วิธีทำ นำส่วนผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปอัดลงในพิมพ์สี่เหลี่ยมจนแน่น เมื่อเคาะออกมาจะได้เครื่องปรุงบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปรสซุปปลาอัดก้อน หนักประมาณ 15 กรัม ซึ่งสามารถนำมาใช้โดยละลายในน้ำร้อนจำนวน 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปประเมินผลทางประสาทสัมผัสโดยพิจารณากลิ่นรสปลา ความใส และกลิ่นรสแปลกปลอม โดยใช้วิธีทดสอบแบบ scoring มีระดับคะแนนตั้งแต่ 0-9 คะแนน รวมทั้งประเมินระดับการยอมรับกลิ่นรสปลา โดยวิธีทดสอบแบบ 9-point hedonic scale โดย 9 คะแนน หมายถึง ชอบมากที่สุด และ 1 คะแนน หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด ในเครื่องปรุงบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปที่ได้จากการผสมผงแห้งที่ได้จากการย่อยสลายด้วยปาเปนและนิวเตรสตริงรูป ซึ่งผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการพ่นฝอยและแช่เยือกแข็ง ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 12 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Randomized Complete Blocks Design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test แบบทดสอบแสดงดังภาคผนวก ก-3.2