บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุดิบ

หอยเม่นหนามยาว พันธุ์ *Diadema setosum*

หอยเม่นหนามสั้น พันธุ์ *Salmacis sphaeroides*

หอยเม่นหนามสั้น พันธุ์ *Toxopneustes pileolus*

เก็บจากสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี)

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

กรดซัลฟูริก	(A.R.)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	(A.R.)
กรดบอริก	(A.R.)
เมธทิลเรด	(A.R.)
เมธทิลีนบลู	(A.R.)
selenium mixture	(A.R.)
คลอโรฟอร์ม	(A.R.)
เมธทานอล	(A.R.)
โปแตสเซียมคลอไรด์	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด

เมธทานอล	(A.R.)
ไดเอธทิลอีเธอร์	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระ

สารมาตรฐาน (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.)

เทารีน	(amino acid analyzer grade)
L-กรดแอสปาร์ติก	(amino acid analyzer grade)
L-ธรีโอนีน	(amino acid analyzer grade)
DL-ซีรีน	(amino acid analyzer grade)
L-แอสปาราจีน	(amino acid analyzer grade)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

L-กรดกลูตามิก	(amino acid analyzer grade)
L-กลูตามีน	(amino acid analyzer grade)
ไกลซีน	(amino acid analyzer grade)
DL-อะลานีน	(amino acid analyzer grade)
L-ซิทรูลิน	(amino acid analyzer grade)
DL-แอลฟา-กรดอะมิโนบิวไทริก	(amino acid analyzer grade)
L-แวลีน	(amino acid analyzer grade)
L-ซิสตีน	(amino acid analyzer grade)
DL-เมไธโอนีน	(amino acid analyzer grade)
ซิสตาธรีโอนีน	(amino acid analyzer grade)
L-ไอโซลิวซีน	(amino acid analyzer grade)
L-ลิวซีน	(amino acid analyzer grade)
L-ไทโรซีน	(amino acid analyzer grade)
L-ฟีนิลอะลานีน	(amino acid analyzer grade)
แอมโมเนีย	(amino acid analyzer grade)
L-ออร์นิธีน	(amino acid analyzer grade)
L-ฮิสติดีน	(amino acid analyzer grade)
L-ไลซีน	(amino acid analyzer grade)
3 เทธิล-L-ฮิสติดีน	(amino acid analyzer grade)
L-ทริปโตเฟน	(amino acid analyzer grade)
L-อาร์จินีน	(amino acid analyzer grade)
L-ไฮดรอกซีโปรลีน	(amino acid analyzer grade)
L-โปรลีน	(amino acid analyzer grade)

reaction reagents

นินไฮดริน	(A.R.)
ลิเธียมอะซีเตด	(A.R.)

สารละลายบัฟเฟอร์s

ไตรลิเธียมซิเตรต ($C_6H_5Li_3O_7 \cdot 4H_2O$)	(A.R.)
ลิเธียมคลอไรด์	(A.R.)
กรดซิตริก ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	(A.R.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิเธียมไฮดรอกไซด์	(A.R.)
ไธโอไดไกลคอล	(A.R.)
กรดคาปริลิก	(A.R.)
briji-35	(A.R.)
กรดไฮโดรคลอริก	(A.R.)
เอธิลแอลกอฮอล์	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ATP และสารอนุพันธ์

สารมาตรฐาน (บริษัท Oriental Yeast Co., Ltd., ประเทศญี่ปุ่น)

adenosine 5'-triphosphate, disodium (ATP-Na_2) purity 85.4%

adenosine 5'-diphosphate, disodium (ADP-Na_2) purity 77.9%

adenosine 5'-monophosphate, disodium (AMP-Na_2) purity 81.5%

inosine 5'-monophosphate, disodium (IMP-Na_2) purity 88.8%

adenosine (Ado) purity 100%

inosine (Ino) purity 100%

hypoxanthine (Hyx) purity 99.0%

ตัวทำละลาย

เมธทานอล	(HPLC grade)

น้ำบริสุทธิ์ เป็นน้ำที่ผ่านระบบการทำให้น้ำบริสุทธิ์แบบ reverse osmosis และ deionization จนน้ำมีความต้านทานไฟฟ้า 18.2 M Ω ซม

กรดฟอสฟอริก	(A.R.)
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้ในการประเมินองค์ประกอบที่ให้รส

เทารีน (บริษัท Fluka Co., Ltd.)	(A.R.)
L-กรดแอสปาร์ติก (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.)	(A.R.)
L-ธรีโอนีน (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.)	(A.R.)
DL-ซีรีน (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.)	(A.R.)
L-แอสปาราจีน (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.)	(A.R.)
โมโนโซเดียม L-กลูตาเมต (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.)	(A.R.)
L-กลูตามีน (บริษัท Himedia Co., Ltd.)	(A.R.)

ไกลซีน (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.) (A.R.)

DL-อะลานีน (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.) (A.R.)

L-แวลีน (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.) (A.R.)

DL-เมไธโอนีน (บริษัท Fluka Co., Ltd.) (A.R.)

L-ไอโซลิวซีน (บริษัท Himedia Co., Ltd.) (A.R.)

L-ลิวซีน (บริษัท Himedia Co., Ltd.) (A.R.)

L-ไทโรซีน (บริษัท Fluka Co., Ltd.) (A.R.)

L-ฟีนิลอะลานีน (บริษัท Himedia Co., Ltd.) (A.R.)

L-ไลซีน (บริษัท Fluka Co., Ltd.) (A.R.)

L-ทริปโตเฟน (บริษัท Fluka Co., Ltd.) (A.R.)

L-อาร์จินีน (บริษัท Nichiri Chemical Co., Ltd.) (A.R.)

อิโนซีนโมโนฟอสเฟต (บริษัท Fluka Co., Ltd.) (A.R.)

กรดไฮโดรคลอริก (A.R.)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (A.R.)

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ

เครื่องชั่งน้ำหนัก (Tanita, 1458N)

เวอร์เนียคาลิปเปอร์ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mitutoyo, Japan)

กรรไกร

spatula

แหนบ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldathem และ Vapodest I, Gerhardt, KT 85)

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, AB204)

ตู้อบ (WTB Binder, E-53)

เตาเผา (Isotemp, FT01/138)

ถ้วยชั่งอะลูมิเนียม

ครูซิเบิล

glass homogenizer

โมเตอร์ (Mighty-stirrer, MT-2)

rotary evaporator (Eyela, N-N)

กรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร

กรวยแก้ว

ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร

ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร

กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 185 มิลลิเมตร

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, 1518)

glass homogenizer

โมเตอร์ (Mighty-stirrer, MT-2)

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermo IEC, IEC MULTI-RF)

หลอดเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ขนาด 80 มิลลิลิตร

rotary evaporator (Eyela, N-N)

กรวยแก้ว

กรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร

ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร

กระดาษกรอง Whatman No.4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร

ขวดพลาสติก ขนาด 60 มิลลิลิตร

ตู้แช่แข็งชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Sanyo, MDF-592)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระ

เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโรอัตโนมัติ (JEOL, JLC 300)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ATP และสารอนุพันธ์

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ประกอบด้วย

- ระบบฉีดตัวอย่าง (Waters, 717Plus Autosampler)
- เครื่องสูบฉีดของเหลว (Waters, 600E Multisolvent Delivery System)
- คอลัมน์ Asahipak GS 320 7G (Shodex, Japan)

ขนาด 7.6 มิลลิเมตร x 500 มิลลิเมตร อนุภาค Hydrophilic polymer

ขนาด 5 ไมครอน

- เครื่องตรวจวัด (Waters, 966 Photodiode Array เครื่องตรวจวัด)

เครื่องวัด pH (Schott, CG 840)

แท่งคนแม่เหล็ก

เครื่องคนสารละลายแม่เหล็กอัตโนมัติ(Thermix, 210T)

filter holder (Advantec, VT-500)

glass microanalysis holder (Advantec, KGS-47)

เครื่องสูบฉีดของเหลวสุญญากาศ (Buchi, Buchi vac V-500)

filter holder (Millipore, Swinnex)

เข็มฉีด ขนาด 10 มิลลิลิตร

แผ่นกรองแบบบาง (Advantec, Japan) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร pore size 0.45 ไมครอน

แผ่นกรองแบบบาง (Advantec, Japan) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร pore size 0.45 ไมครอน (mixed cellulose ester)

แผ่นกรองแบบบาง (Advantec, Japan) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร pore size 0.45 ไมครอน (PTFE)

ขวดใส่สารตัวอย่าง ขนาด 1 มิลลิลิตร

อุปกรณ์ที่ใช้ในการประเมินองค์ประกอบที่ให้รส

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, A200S)

เครื่องวัด pH (Schott, CG 840)

แท่งคนแม่เหล็ก

เครื่องคนสารละลายแม่เหล็กอัตโนมัติ(Thermix, 210T)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ศึกษาผลของพันธุ์ (species) ของหอยเม่นที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารสกัดจากไข่หอยเม่น

ใช้หอยเม่น 3 พันธุ์ คือ หอยเม่นหนามยาว พันธุ์ *Diadema setosum* หอยเม่นหนามสั้น พันธุ์ *Salmacis sphaeroides* และพันธุ์ *Toxopneustes pileolus* โดยเก็บหอยเม่นพันธุ์ *Diadema setosum* ที่บริเวณน้ำตื้นของสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ส่วนหอยเม่นพันธุ์ *Salmacis sphaeroides* และพันธุ์ *Toxopneustes pileolus* จะเก็บได้ที่เกาะค้างคาวซึ่งเป็นเกาะลูกของเกาะสีชัง ในทะเลน้ำลึก ประมาณ 7 เมตร โดยหอยเม่นหนามสั้นทั้งสองพันธุ์จะแทรกตัวอยู่ในทราย (รูปที่แสดงลักษณะภายนอกและลักษณะของไข่ของหอยเม่นทั้งสามชนิด แสดงไว้ในภาคผนวก ง)

นำหอยเม่นทั้งสามพันธุ์มาทดลองตามขั้นตอน ดังต่อไปนี้

3.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

↓

เก็บใน ice box ที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง

↓

ขนส่งมายัง Food Processing Laboratory ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

↓

นำไข่หอยเม่นมาบรรจุในถุง laminate (PET / Al / linear-LDPE) อีกชั้น

↓

ผนึกถุงแบบสุญญากาศ (-1.0 bar)

↓

นำไข่หอยเม่นมาเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -40°ซ

3.1.2 คำนวณหา gonad index (%)

จากสูตร $$\text{gonad index (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของไข่หอยเม่น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของหอยเม่นทั้งตัว (กรัม)}} \times 100 \quad \text{.....(3.1)}$$

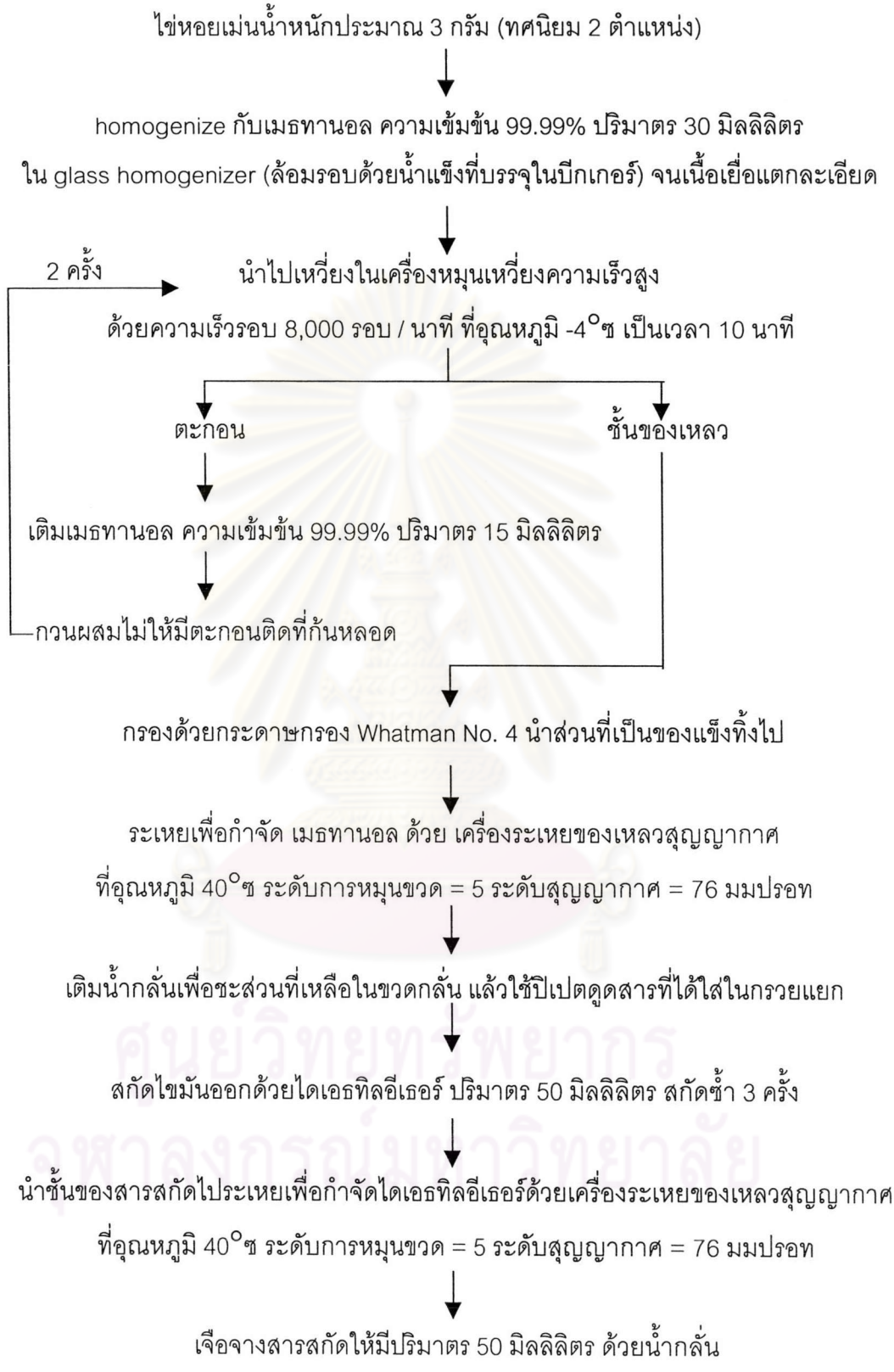
วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยใช้หอยเม่นหนามยาว พันธุ์ *Diadema setosum* จำนวน 40 ตัว หอยเม่นหนามสั้น พันธุ์ *Salmacis sphaeroides* จำนวน 16 ตัว และพันธุ์ *Toxopneustes pileolus* จำนวน 27 ตัว วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Package for the Social Science (SPSS) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) (Cochran และ Cox, 1992)

3.1.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่หอยเม่น โดยวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ปริมาณโปรตีน ปริมาณเถ้า (A.O.A.C., 1995) และปริมาณไขมัน (Shirai และคณะ, 1997) โดยวิธีวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ 6 ตัว สำหรับหอยเม่นหนามยาว พันธุ์ *Diadema setosum* และวิเคราะห์ 3 ตัว สำหรับหอยเม่นหนามสั้น พันธุ์ *Salmacis sphaeroides* และพันธุ์ *Toxopneustes pileolus* วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DNMRT (Cochran และ Cox, 1992)

ในการทดลองจะคัดเลือกไข่หอยเม่นที่มีสีและน้ำหนักของรวงไข่ใกล้เคียงกันจากหอยเม่นที่เก็บมาทั้งหมด มาใช้ในการทดลอง

3.1.4 การเตรียมสารสกัด (Shirai และคณะ, 1996)



↓

เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -40°ซ ในตู้แช่แข็ง
เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดเมื่อพร้อม

3.1.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากไข่หอยเม่น

ก. วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ โดยใช้ เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนอัตโนมัติ (JEOL, JLC 300)

สภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

ปริมาตรในการฉีดสาร: 50 ไมโครลิตร

ความเข้มข้นของสารละลายเฟสเคลื่อนที่: นินไฮดริน ความเข้มข้น 0.11 โมล / ลิตร
ลิเธียมอะซีเตด ความเข้มข้น 0.4 โมล / ลิตร

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่: 0.30 มิลลิลิตร / นาที

ความเข้มข้นของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ ดังตาราง

	1st buffer	2nd buffer	3rd buffer	4th buffer	5th buffer	6th buffer
ไตรลิเธียมซิเตรต $\cdot 4H_2O$ (กรัม)	9.9	9.9	35.3	69.4	69.4	0
ลิเธียมคลอไรด์ (กรัม)	1.9	6.2	17.3	33.9	33.9	0
กรดซิตริก $\cdot H_2O$ (กรัม)	12.6	2.1	0	0	0	0
ลิเธียมไฮดรอกไซด์ (กรัม)	0	0	0	0	0	16.8
ไธโอไดไกลคอล (มิลลิลิตร)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0
กรดคาปริลิก (มิลลิลิตร)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0
briji-35 ความเข้มข้น 20% (มิลลิลิตร)	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	0
กรดไฮโดรคลอริก (มิลลิลิตร)	4.0	6.0	0	0	0	0
เอธิลแอลกอฮอล์ (มิลลิลิตร)	33.0	0	0	0	0	0
H_2O (มิลลิลิตร)	950.0	970.0	960.0	930.0	930.0	980.0
pH	2.93	3.28	3.46	2.83	3.65	-
elution time (นาที)	12	29	31	12	28	18
คอลัมน์ temperature (°ซ)	34	46	66	66	66	66

อัตราการไหลของ สารละลายบัฟเฟอร์: 0.58 มิลลิลิตร / นาที

คอลัมน์: JEOL anion exchange resin type ขนาด 6.0 มิลลิเมตร x 90 มิลลิเมตร

เครื่องตรวจวัด: JEOL visual type โดยวัด α-amino acid ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และ imino acid เช่น proline และ hydroxyproline ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. วิเคราะห์ปริมาณ ATP และสารอนุพันธ์ ดังนี้ ATP, ADP, AMP, IMP, adenosine (Ado), inosine (Ino) และ hypoxanthine (Hyx) โดยใช้เทคนิค HPLC

สภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

ปริมาตรในการฉีดสาร: 20 ไมโครลิตร

ความเข้มข้นของสารละลายเฟสเคลื่อนที่: สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์

pH ของสารละลายเฟสเคลื่อนที่: 2.90

อัตราการไหล: 1.0 มิลลิลิตร / นาที

คอลัมน์: Asahipak GS 320 7G ขนาด 7.6 มิลลิเมตร x 500 มิลลิเมตร อนุภาค hydrophilic polymer ขนาด 5 ไมครอน

เครื่องตรวจวัด: photodiode array ที่ความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร

วิเคราะห์ 6 ตัว แสดงผลการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ยและช่วงของค่าต่ำที่สุดถึงค่าสูงที่สุด

3.2 ศึกษาผลของฤดูกาลที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารสกัดจากไข่หอยเม่น

ใช้หอยเม่นหนามยาว พันธุ์ *Diadema setosum* โดยเก็บตัวอย่างหอยเม่นในเดือนกรกฎาคม ตุลาคม 2544 เดือนมกราคม เมษายน และกรกฎาคม 2545

นำหอยเม่นมาเตรียมวัตถุดิบ เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1คำนวณหา gonad index (%) ตามสูตร (3.1) โดยเก็บตัวอย่างหอยเม่นในเดือนกรกฎาคม 2544 จำนวน 34 ตัว ตุลาคม 2544 จำนวน 105 ตัว เดือนมกราคม 2545 จำนวน 40 ตัว เมษายน 2545 จำนวน 46 ตัว และกรกฎาคม 2545 จำนวน 52 ตัว โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DNMRT (Cochran และ Cox, 1992)

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่หอยเม่น ตามข้อ 3.1.3 วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ 6 ตัว วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DNMRT (Cochran และ Cox, 1992)

เตรียมสารสกัด เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากไข่หอยเม่น โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.1.5 วิเคราะห์ 6 ตัว แสดงผลการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ยและช่วงของค่าต่ำที่สุดถึงค่าสูงที่สุด

3.3 ศึกษาผลของกระบวนการให้ความร้อนที่มีต่อองค์ประกอบของสารสกัดจากไข่หอยเม่น

3.3.1 นำหอยเม่นหนามยาว พันธุ์ *Diadema setosum* ที่ยังมีชีวิต มาตัดหนาม แล้วให้ความร้อนทั้งตัวหรือทั้งเปลือก โดยการต้มในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิน้ำเดือด (98-100°ซ) เป็นเวลา 0 และ 2 นาที โดยต้มที่เกาะสีชัง แล้วนำมาเตรียมวัตถุดิบ เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 เตรียมสารสกัด เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากไข่หอยเม่น เช่นเดียวกับข้อ 3.1.5 (ก. และ ข.)

วิเคราะห์ 6 ตัว สำหรับไข่หอยเม่น พันธุ์ *Diadema setosum* ที่ไม่ต้ม และวิเคราะห์ 5 ตัว สำหรับไข่หอยเม่น พันธุ์ *Diadema setosum* ที่ต้ม แสดงผลการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ยและช่วงของค่าต่ำที่สุดถึงค่าสูงที่สุด

3.3.2 นำหอยเม่นหนามสั้น พันธุ์ *Salmacis sphaeroides* ที่ยังมีชีวิต มาให้ความร้อนทั้งตัวหรือทั้งเปลือก โดยการต้มในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิน้ำเดือด (98-100° ซ) เป็นเวลา 0 และ 2 นาที โดยต้มที่เกาะสีชัง แล้วนำมาเตรียมวัตถุดิบ เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 เตรียมสารสกัด เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากไข่หอยเม่น เช่นเดียวกับข้อ 3.1.5 (ก. และ ข.)

วิเคราะห์ 6 ตัว สำหรับไข่หอยเม่น พันธุ์ *Salmacis sphaeroides* ที่ไม่ต้ม และวิเคราะห์ 5 ตัว สำหรับไข่หอยเม่น พันธุ์ *Salmacis sphaeroides* ที่ต้ม แสดงผลการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ยและช่วงของค่าต่ำที่สุดถึงค่าสูงที่สุด

3.3.3 นำหอยเม่นหนามสั้น พันธุ์ *Toxopneustes pileolus* ที่ยังมีชีวิต มาให้ความร้อนทั้งตัวหรือทั้งเปลือก โดยการต้มในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิน้ำเดือด (98-100° ซ) เป็นเวลา 0 และ 2 นาที โดยต้มที่เกาะสีชัง แล้วนำมาเตรียมวัตถุดิบ เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 เตรียมสารสกัด เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากไข่หอยเม่น เช่นเดียวกับข้อ 3.1.5 (ก. และ ข.)

วิเคราะห์ 6 ตัว สำหรับไข่หอยเม่น พันธุ์ *Toxopneustes pileolus* ที่ไม่ต้ม และวิเคราะห์ 5 ตัว สำหรับไข่หอยเม่น พันธุ์ *Toxopneustes pileolus* ที่ต้ม แสดงผลการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ยและช่วงของค่าต่ำที่สุดถึงค่าสูงที่สุด

3.4 ประเมินหาองค์ประกอบที่ให้รส (taste active components) ของไข่หอยเม่น

ประเมินหาองค์ประกอบที่ให้รสของไข่หอยเม่นโดยใช้การทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธี omission test (Shirai และคณะ, 1997) ใช้ผู้ทดสอบที่ฝึกฝนแล้ว (trained panelist) จำนวน 6 คน (ขั้นตอนการฝึกฝนและคัดเลือกแสดงไว้ในภาคผนวก ข และแบบทดสอบที่ใช้ในการคัดเลือกแสดงในภาคผนวก ค.1 และ ค.2) ทดสอบคนละ 3 ครั้ง ใช้แบบทดสอบแบบ triangle test (แบบทดสอบแสดงไว้ในภาคผนวก ค.3) เปรียบเทียบความเข้มข้นของรสระหว่างสารละลายทดสอบ (taste test solution) ที่ไม่เติมสารเคมีบางชนิดกับสารละลายทดสอบที่ประกอบด้วยสารเคมีที่ให้รสของไข่หอยเม่นพันธุ์ *Diadema setosum* ที่เก็บในเดือนตุลาคม 2544 ครบทุกชนิด ให้คะแนนความเข้มข้นของรสหวาน รสเค็ม รสเปรี้ยว รสขม และรส umami ดังนี้ 2=รสเข้มกว่ามาก, 1=รสค่อนข้างเข้มกว่า, 0=รสเหมือนกัน, -1=รสค่อนข้างอ่อนกว่า และ –2=รสอ่อนกว่ามาก วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี t-test (Cochran และ Cox, 1992)

องค์ประกอบของสารละลายทดสอบตั้งต้น แสดงในตารางที่ 3.1 ซึ่งประกอบด้วยองค์ประกอบของสารต่างๆ ที่ได้จากการวิเคราะห์ในขั้นที่ผ่านมา โดยจะเลือกใช้องค์ประกอบของสารสกัดของไข่หอยเม่นที่เก็บในเดือนตุลาคม 2544 ในการประเมินหาองค์ประกอบที่ให้รสของไข่หอยเม่น เนื่องจากไข่หอยเม่นที่เก็บในเดือนนี้มีปริมาณไขมันต่ำที่สุด ดังนั้นในการเตรียมสารละลายทดสอบจึงไม่จำเป็นต้องเติมไขมันลงไป ซึ่งการเติมไขมันจะทำให้การเตรียมสารละลายทดสอบทำได้ยาก และไขมันที่เติมลงไปอาจจะมีอิทธิพลต่อต่อมรับรส (taste buds) ของลิ้นแล้วทำให้ผู้ทดสอบสามารถทดสอบและรับรู้รสต่างๆ ของสารละลายทดสอบได้ยากขึ้น และองค์ประกอบของสารละลายทดสอบตั้งต้นจะประกอบด้วยองค์ประกอบของสารต่างๆ มีปริมาณตั้งแต่ 10 มิลลิกรัม / 100 กรัม (Shirai และคณะ, 1997) ซึ่งในการทดลอง เติม aspartic acid ซึ่งมีปริมาณเพียง 5 มิลลิกรัม / 100 กรัม ในเนื้อเยื่อไข่หอยเม่นที่เก็บในเดือนตุลาคม 2544 เนื่องจาก aspartic acid อาจจะเป็นองค์ประกอบที่ให้รสของไข่หอยเม่น โดยจะเติมในปริมาณ 10 กรัม / 75 กรัม และไม่เติม histidine และ 3 methyl histidine ทั้งที่มีปริมาณมากกว่า 10 มิลลิกรัม / 100 กรัม เนื่องจากเป็นสารเคมีที่ไม่มีรส แม้จะมีปริมาณมากถึง 1000 มิลลิกรัม / 100 กรัม และเป็นสารเคมีที่หาซื้อยากส่วน tyrosine จะเติมเพียง 30 มิลลิกรัม / 75 กรัม เนื่องจาก tyrosine สามารถละลายในน้ำได้เพียง 0.453 กรัม / ลิตร ที่อุณหภูมิ 25°ซ จึงไม่สามารถเติมในปริมาณ 80 มิลลิกรัม / 75 กรัม ได้

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของสารละลายทดสอบตั้งต้น

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัม / 75 กรัม)
Taurine	250
Aspartic acid	10
Threonine	70
Serine	30
Asparagine	20
Glutamic acid	65
Glutamine	25
Glycine	195
Alanine	85
Valine	200
Methionine	60
Isoleucine	140
Leucine	180
Tyrosine	30
Phenylalanine	45
Lysine	140
Tryptophan	40
Arginine	200
IMP	25

นำองค์ประกอบต่างๆ ดังตาราง 3.1 มาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 75 มิลลิลิตร (เทียบได้กับ 75 กรัม เมื่อพิจารณาความหนาแน่นของน้ำเป็น 1 กรัม / มิลลิลิตร) ซึ่งเท่ากับปริมาณความชื้นของไข่หอยเม่นพันธุ์ *Diadema setosum* ที่เก็บในเดือนตุลาคม 2544 และปรับ pH เป็น 5.29 ซึ่งเป็น pH ของสารสกัดจากไข่หอยเม่นพันธุ์ *Diadema setosum* ที่เก็บในเดือนตุลาคม 2544 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Shirai และคณะ, 1997) ความเข้มข้น 6 N สาเหตุที่ใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องการให้ปริมาตรของสารละลายทดสอบหลังปรับ pH เปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด และก่อนที่จะนำสารละลายทดสอบตั้งต้นนี้ไปใช้ประเมินหาองค์ประกอบที่ให้รสของไข่หอยเม่นพันธุ์ *Diadema setosum* ที่เก็บในเดือนตุลาคม 2544 จะต้องทดสอบว่าสารละลายทดสอบตั้งต้นนี้มีรสเหมือนกับสารสกัดจากไข่หอยเม่นพันธุ์ *Diadema setosum* ที่เก็บในเดือนตุลาคม 2544 ซึ่งในงานวิจัยนี้ Assoc. Prof. Dr. Takaaki Shirai ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญชาวญี่ปุ่น

และมีประสบการณ์ในการทำ omission test เพื่อกำหนด taste active components ในสัตว์ทะเลบางชนิด ช่วยทดสอบและฝึกฝนให้ผู้วิจัย จนสรุปได้ว่าสารละลายทดสอบตั้งต้นนี้มีรสเหมือนกับสารสกัดจากไข่หอยเม่นพันธุ์ *Diadema setosum* ที่เก็บในเดือนตุลาคม 2544 จึงสามารถนำสารละลายทดสอบตั้งต้นนี้ไปใช้ประเมินหาองค์ประกอบที่ให้รสของไข่หอยเม่นพันธุ์ดังกล่าวต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย