

การตรึงเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเพื่อใช้วัดความสดของปลา



นายบริพันธ์ คงเฝ้า

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-0483-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMOBILIZATION OF XANTHINE OXIDASE FOR DETERMINATION OF FISH
FRESHNESS



Mr. Boripan Kongpow

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology
Department of Food Technology

Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2000
ISBN 974-13-0483-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึงเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเพื่อใช้วัดความสดของปลา
โดย	นายบริพันธ์ คงเฝ้า
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.มัณฑุมาส เฮงสกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจริต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ ธีรพิทยากุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.มัณฑุมาส เฮงสกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บริพันธ์ คงเฝ้า : การตรึงเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเพื่อใช้วัดความสดของปลา (IMMOBILIZATION OF XANTHINE OXIDASE FOR DETERMINATION OF FISH FRESHNESS) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร.มัญชุมาศ เฮงสกุล, 95 หน้า. ISBN 974-13-0483-8

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนเม็ดแก้วสำหรับวัดความสดของปลาด้วยการหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลา จากการทดลองตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวเม็ดแก้วด้วยพันธะโควาเลนต์จากการใช้สารละลาย Aminopropyltriethoxysilane (APTS) เป็นสารกระตุ้นเม็ดแก้ว และใช้สารละลาย Glutaraldehyde เป็นสารเชื่อมระหว่างเม็ดแก้วกับเอนไซม์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้สารละลาย APTS เข้มข้น 10 % v/v ใช้สารละลาย Glutaraldehyde เข้มข้น 5 % v/v ใช้เม็ดแก้วขนาด 50 – 100 mesh ปริมาณ 2.00 กรัม ใช้เอนไซม์เข้มข้น 0.20 U/ml เอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงถูกล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีคุณสมบัติ คือ มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 8.0 และ 35 °C ตามลำดับ สามารถทำปฏิกิริยาซ้ำได้ไม่ต่ำกว่า 4 ครั้งที่อุณหภูมิ 25 °C และมีอายุการใช้งานไม่ต่ำกว่า 20 วัน ถ้าเก็บไว้ที่ 4 °C เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปไปวัดปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* และปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ระหว่างที่เก็บในน้ำแข็ง เป็นเวลาไม่เกิน 14 วัน พบว่า การวัดปริมาณ Hypoxanthine ด้วยเอนไซม์อิสระกับการวัดปริมาณ Hypoxanthine ด้วยเอนไซม์ตรึงรูปมีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างมาก ($r^2=0.96$ สำหรับเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* $r^2=0.90$ สำหรับเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* และ $r^2=0.95$ สำหรับเนื้อปลาตาหวาน)

เกณฑ์ในการตัดสินความสดของปลาจากปริมาณ Hypoxanthine สำหรับปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* และ ปลาตาหวาน คือ ถ้าปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* และปลาตาหวานที่มีความสดมาก จะมีปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.12 0.20 และ 0.20 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และถ้าปลาเริ่มเน่าจะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 0.80 1.00 และ 0.50 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ

ภาควิชา..... เทคโนโลยีทางอาหาร
สาขาวิชา..... เทคโนโลยีทางอาหาร
ปีการศึกษา..... 2543

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4072295823 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : XANTHINE OXIDASE / FISH FRESHNESS / HYPOXANTHINE / IMMOBILIZATION

BORIPAN KONGPOW ; IMMOBILIZATION OF XANTHINE OXIDASE FOR DETERMINATION OF FISH FRESHNESS. THESIS ADVISOR: ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D. THESIS COADVISOR: MANCHUMAS HENGSAKUL, Ph.D.
95 pp. ISBN 974-13-0483-8

The objective of this study is the preparation of immobilized xanthine oxidase for the determination of fish freshness, by measuring the amount of hypoxanthine in fish muscle. Xanthine oxidase was immobilized on glass bead by covalent method. Two solutions were employed. Aminopropyltriethoxysilane (APTS) was used to activate glass bead, and then glutaraldehyde was used to link between glass bead and the enzyme. It was found that the optimum condition was to use 10% v/v of APTS and 5% v/v of glutaraldehyde for enzyme immobilization. The amount of glass bead (50 – 100 mesh) had to be 2 grams and the concentration of enzyme was 0.20 U/ml. The unbound enzyme was then rinsed twice with distilled water.

An immobilized enzyme had optimum pH and temperature at 8.0 and 35 °C, respectively. Enzyme was capable to react repeatedly at least 4 times at 25 °C, and could last for 20 days at 4 °C. An immobilized enzyme was then used to determine hypoxanthine in two species of Threadfin bream, *Nemipterus hexodon* and *Nemipterus furcosus*, and Bigeye fish (*Priacanthus tayenus*) which were kept on ice for less than 14 days. Results obtained from the use of free enzyme and immobilized enzyme were significantly related ($r^2=0.96$ for *Nemipterus hexodon* muscle, $r^2=0.90$ for *Nemipterus furcosus* muscle and $r^2=0.95$ for Bigeye fish muscle).

The determination of fish freshness from the amount of hypoxanthine for *Nemipterus hexodon*, *Nemipterus furcosus* and Bigeye fish were found to be less than 0.12, 0.20 and 0.20 $\mu\text{mole/g}_{\text{sample}}$ respectively for very fresh fish and more than 0.80, 1.00 and 0.50 $\mu\text{mole/g}_{\text{sample}}$ respectively for the fish which started to deteriorate.

Department.....Food Technology.....Student's signature.....
Field of study.....Food Technology.....Advisor's signature.....
Academic year.....2000.....Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.มัณฑุมาศ เฮงสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ให้ความรู้ คำแนะนำ และแนวคิดที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ผู้เขียนรู้สึกซาบซึ้งถึงความเอื้ออาทรและความห่วงใยของอาจารย์ ที่มีต่อผู้เขียนอย่างยิ่งมาโดยตลอด

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ ภัฏพิทยากุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเถียร คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และให้คำแนะนำวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ และผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ทั้งยังให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ผู้เขียน

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรที่ให้ความอนุเคราะห์ จนทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ผู้เขียนขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโทภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่เปี่ยมล้นด้วยน้ำใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณอรชิต ชื่นชูจิตต์ ที่ให้ความช่วยเหลือผู้เขียนด้วยความเต็มใจยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจอย่างดียิ่งตลอดมา รวมทั้งขอขอบคุณ คุณวิภาวรรณ วงษ์สุวรรณ ผู้เต็มใจให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน และคอยให้กำลังใจแก่ผู้เขียนเสมอมา

บริพันธ์ คงเฝ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 วารสารปริทัศน์	3
3 การทดลอง.....	17
4 ผลการทดลอง	33
5 วิจัยณ์ผลการทดลอง	56
6 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	66
รายการอ้างอิง	69
ภาคผนวก	73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	เกณฑ์ของปริมาณ TVB-N ในการบ่งบอกคุณภาพความสดของปลา..... 5
2	ค่าความเหนียวของเจลซูริมิ (Gel strength) ที่ทำจากปลา Alaska pollock ที่ระดับความสดต่างๆ 16
3	ขนาดของเม็ดแก้วที่มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป 33
4	ความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde ที่มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป 34
5	ปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดโดยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสรและเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป ลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความเหนียวของเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus hexodon</i> ที่ระยะเวลาต่างๆ..... 53
6	ปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดโดยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสรและเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป ลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความเหนียวของเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus furcosus</i> ที่ระยะเวลาต่างๆ 54
7	ปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดโดยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสรและเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป ลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความเหนียวของเนื้อปลาตาหวาน (<i>Priacanthus tayenus</i>) ที่ระยะเวลาต่างๆ 55
8	เกณฑ์ในการให้คะแนนจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพต่างๆของปลา 78
9	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของกรด Uric ที่ได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป เมื่อใช้ APTS 2% 5% 10% และ Glutaraldehyde (GLT) 3% 5% ในการตรึงเอนไซม์ 85
10	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของกรด Uric ที่ได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป เมื่อใช้ปริมาณเม็ดแก้ว 2.00 3.00 และ 4.00 กรัมในการตรึงเอนไซม์ 85

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
11	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของกรด Uric ที่ได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase 0.10 0.20 0.40 และ 0.60 U/ml ในการตรึงเอนไซม์..... 86
12	การวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างแบบจับคู่โดยวิธี t test (Paired – samples t test) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ใส่สารละลาย HCl กับไม่ใส่สารละลาย HCl 86
13	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus hexodon</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง 86
14	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus hexodon</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง 87
15	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่า TVB ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus hexodon</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง 87
16	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus hexodon</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง 87
17	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าความเหนียว (Gel strength) ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus hexodon</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง 88
18	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus furcosus</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง 88
19	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus furcosus</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง 88

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
20	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่า TVB ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus furcosus</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง	89
21	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ในเนื้อปลา ทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus furcosus</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง	89
22	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าความเหนียว (Gel strength) ในเนื้อ ปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus furcosus</i> ที่เก็บในน้ำแข็ง	89
23	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วย เอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระในเนื้อปลาตาหวาน (<i>Priacanthus tayenus</i>) ที่เก็บในน้ำแข็ง	90
24	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วย เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปในเนื้อปลาตาหวาน (<i>Priacanthus tayenus</i>) ที่เก็บในน้ำแข็ง	90
25	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่า TVB ในเนื้อปลาปลาตาหวาน (<i>Priacanthus tayenus</i>) ที่เก็บในน้ำแข็ง	90
26	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ในเนื้อปลา ตาหวาน (<i>Priacanthus tayenus</i>) ที่เก็บในน้ำแข็ง	91
27	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าความเหนียว (Gel strength) ในเนื้อ ปลาตาหวาน (<i>Priacanthus tayenus</i>) ที่เก็บในน้ำแข็ง	91

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	การสลายตัวของนิวคลีโอไทด์ในปลา	6
2	ความสัมพันธ์ของปริมาณ Hypoxanthine ในปลา whiting ที่เก็บไว้ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 0 °C กับเวลาที่เก็บ	7
3	วิธีการเตรียมสารสกัดจากปลาตัวอย่าง	9
4	ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase กับ Hypoxanthine	9
5	การตรึงเอนไซม์ด้วย Glutaraldehyde	11
6	วิธีการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase	12
7	การทำ Silanization บน CPG	13
8	ขั้นตอนการทำ Silanization ของเม็ดแก้ว และการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวของเม็ดแก้ว	20
9	การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป	21
10	การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ	25
11	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดปลาตัวอย่างและหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลา ด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ	29
12	ขั้นตอนการหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป	31
13	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาเอนไซม์กับปริมาณเม็ดแก้ว	35
14	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาเอนไซม์กับความเข้มข้นของเอนไซม์	36
15	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาเอนไซม์กับจำนวนครั้งของการล้าง	37
16	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป และเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระกับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทำปฏิกิริยา	38
17	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป และเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระกับอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา	39

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
18	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์กับจำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 °C 40
19	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและ %Initial activity กับจำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิ 25 °C..... 41
20	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm กับปริมาณเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry..... 42
21	ความสัมพันธ์ระหว่าง %Initial activity กับระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ..... 43
22	ภาพถ่ายเม็ดแก้วสะอาดกำลังขยาย 100 เท่า 44
23	ภาพถ่ายเม็ดแก้วสะอาดกำลังขยาย 750 เท่า 45
24	ภาพถ่ายเม็ดแก้วสะอาดกำลังขยาย 10,000 เท่า 45
25	ภาพถ่ายเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป กำลังขยาย 10,000 เท่า..... 46
26	ภาพถ่ายเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป กำลังขยาย 35,000 เท่า..... 46
27	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระในเนื้อปลาทรายแดง และเนื้อปลาทูหวานที่เก็บไว้ในน้ำแข็งกับระยะเวลาการเก็บ..... 47
28	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus hexodon</i> 48
29	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus furcosus</i> 49
30	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระในเนื้อปลาทูหวาน..... 50

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
31	ความสัมพันธ์ระหว่าง %Initial activity ของเอนไซม์ Xanthine oxidase กับจำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำ	51
32	กราฟมาตรฐานของสารละลาย Hypoxanthine ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Xanthine oxidase ดั้งรูป	74
33	กราฟมาตรฐานของสารละลาย Hypoxanthine ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสาระ	75
34	กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	77
35	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงต้านการเจาะ (Force) กับระยะทางของการเจาะ (Distance)ที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Texture analyzer (TA-XT2i)	84
36	ปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus hexodon</i>	92
37	ปลาทรายแดงพันธุ์ <i>Nemipterus furcosus</i>	92
38	ปลาตาหวาน (<i>Priacanthus tayenus</i>)	93
39	เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Jasco, V530)	93
40	เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer, TA-XT2i)	94

บทที่ 1

บทนำ

ความสดของปลามีความสำคัญมากต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ปลาเป็นวัตถุดิบ ไม่ว่าจะเป็น ปลาแช่เยือกแข็ง ชูริมิ ปูอัด และลูกชิ้นปลา เป็นต้น โดยความสดมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางด้านรสชาติ และทางด้านเนื้อสัมผัส นั่นคือปลาที่มีความสดจะมีรสชาติดี มีรสหวานที่เกิดจาก Inosine monophosphate และกรดอะมิโนพวก Glycine และ Glutamic acid และสามารถในการเกิดเจลของเนื้อปลาจะมีคุณภาพดี ทำให้ได้เจลที่แข็งแรง มีความยืดหยุ่นสูง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีคุณภาพดี

วิธีการวัดความสดของปลามีหลายวิธี ได้แก่ วิธีการวัดทางกายภาพ ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงในการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของปลา วิธีการวัดทางจุลินทรีย์ที่ต้องใช้เวลานานกว่าจะได้ผลวิเคราะห์ วิธีการวัดทางประสาทสัมผัสโดยคุณลักษณะทางกายภาพ เช่น เหงือก ตา เกล็ด ท้อง รวมถึงการดมกลิ่น ซึ่งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบ และควรทำความเข้าใจกับวิธีการวัดทางเคมี เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องยิ่งขึ้น วิธีการเคมีที่นิยมใช้กัน ได้แก่ การหาปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Base-Nitrogen, TVB-N) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของเอนไซม์จากแบคทีเรีย ดังนั้นจึงเป็นวิธีการวัดความสดของปลาในระยะหลังของการเปลี่ยนแปลงในตัวปลา ส่วนการวัดความสดของปลาในระยะแรกตั้งแต่หลังปลาทายใหม่ ๆ นั้น จะใช้การหาปริมาณสารที่เกิดจากการสลายตัวของนิวคลีโอไทด์จากปฏิกิริยา Autolysis ในตัวปลา ได้แก่ การหาปริมาณ Inosine monophosphate หรือปริมาณ Hypoxanthine การวัดความสดของปลาโดยการหาปริมาณ Hypoxanthine สามารถวัดได้ด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ร่วมกับการใช้เครื่อง Spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ การใช้เอนไซม์นั้นมีความเฉพาะเจาะจงสูง ได้ผลอย่างรวดเร็ว แต่เอนไซม์มีราคาแพง ใช้ได้ครั้งเดียว ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ การตรึงเอนไซม์จึงเป็นทางเลือกที่สำคัญในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ได้อีกหลายๆ ครั้ง ทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในเรื่องของเอนไซม์ได้

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการวัดความสดของปลาโดยการหาปริมาณ Hypoxanthine ด้วยการใช้เอนไซม์ Xanthine oxidase ที่ตรึงบนผิวของเม็ดแก้วด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยใช้สาร Aminopropyltriethoxysilane ร่วมกับ Glutaraldehyde โดยศึกษาภาวะของการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสม ศึกษาสมบัติความคงตัว และอายุการใช้งานของเอนไซม์ตรึงรูป และศึกษาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทูลายแดง (*Nemipterus hexodon*) และเนื้อปลา

ตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ที่เป็นวัตถุอันตรายในอุตสาหกรรมซูริมิ เปรียบเทียบกับการวัดความสดของปลาโดยการสังเกตลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB-N และปริมาณจุลินทรีย์ รวมทั้งหาค่าความเหนียว (Gel strength) ของเจลที่เตรียมจากเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 การวัดความสดของปลา

ความหมายของความสด

เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่าความสดมีความสำคัญอย่างมากต่อคุณภาพของปลาและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ปลาเป็นวัตถุดิบ ความหมายของความสดไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนและเฉพาะเจาะจงอย่างแท้จริง มีผู้นิยามความหมายของความสดไว้แตกต่างกัน ได้แก่

"ความสดสื่อถึงระดับเชื้อจุลินทรีย์หรือการเสื่อมเสียทางด้านเคมีที่เกิดขึ้น" (Martin ,1988)

"อาหารทะเลที่มีความสด คือ อาหารทะเลที่มีลักษณะเหมือนอาหารทะเลที่จับขึ้นมาใหม่ๆ" (Waterman ,1982)

"ปลาที่มีความสดตามธรรมชาติทั้งที่เป็น fillet หรือเนื้อปลาสด ต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะของการแช่เยือกแข็ง ปฏุง แช่เกลือ และอื่นๆ" (Canada department of fisheries and oceans,1992)

จากคำนิยามต่างๆ พบว่า ความสดนั้นสามารถอธิบายได้ในด้านต่างๆคือ ขั้นตอนตั้งแต่การจับปลาหรืออาหารทะเลขึ้นมาจนถึงส่งไปยังที่เก็บรักษาหรือที่อื่นๆต้องมีระยะเวลาที่สั้น ต้องไม่ผ่านกระบวนการผลิตที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้แก่ การหุงต้ม แช่เกลือ แช่เยือกแข็ง และอื่นๆ ลักษณะปรากฏ กลิ่น รส เนื้อสัมผัส ที่เหมือนกับจับขึ้นมาใหม่ๆ การเปลี่ยนแปลงทางด้านต่างๆ ได้แก่ ทางด้านเคมี จุลินทรีย์ และกายภาพ ที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด

ความสำคัญของความสด

- รสชาติ ปลาที่สดจะมีรสหวานที่เกิดจาก Inosine monophosphate (IMP) และกรดอะมิโน เช่น Glycine และ Glutamic acid เมื่อปลาไม่สดรสหวานจะหายไป และเกิดรสขมของ Hypoxanthine ขึ้น

- ความสามารถในการเกิดเจล ปลาที่มีความสดสูงคุณภาพของโปรตีนโดยเฉพาะ Myofibrillar protein ที่เป็นโปรตีนสำคัญในการเกิดเจล ยังคงมีคุณภาพที่ดีอยู่ ส่งผลให้การเกิดเจลเกิดขึ้นได้ดี เมื่อปลาไม่สด Myofibrillar protein จะเสียสภาพไป มีผลทำให้เกิดเจลที่ไม่แข็งแรง

วิธีการวัดความสดของปลา

แบ่งออกเป็น 4 วิธี

1. วิธีทางกายภาพ

การวัดความสดของปลาโดยวิธีทางกายภาพเป็นการวัดความสดโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของปลาหลังการตาย ได้แก่ การวัดแรงดันไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Torry freshness meter อาศัยหลักการการนำไฟฟ้าของเนื้อปลาลดลงเมื่อความแข็งตัวของเนื้อปลาลดลง โดยความแข็งตัวของเนื้อปลาลดลงนี้จะแปรผันโดยตรงกับความสดที่ลดลง (นงลักษณ์ สุทธิวินิช, 2531) หรือการวัดแรงกดโดยใช้เครื่อง Texture analyzer TA-XT2i ที่ใช้วัดปลาแชลมนจากมหาสมุทรแอตแลนติก ซึ่งประกอบด้วย เซ็มแหลมกดลงในตัวอย่างเนื้อปลา แล้วอ่านค่าแรงกดออกมาเป็นตัวเลข ปลาที่มีความสดสูงจะมีค่าแรงกดที่สูงด้วย (Botta, 1995)

2. วิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัส

การประเมินค่าความสดทางประสาทสัมผัสเป็นวิธีการวัดคุณภาพทางตรง (Subjective measurement) เป็นเรื่องค่อนข้างยาก เนื่องจากเป็นการตรวจสอบคุณภาพรวมโดยใช้ระบบประสาทสัมผัสทั้ง 4 คือ การชิมรส (Taste) การดมกลิ่น (Smell) การสัมผัส (Touch) และการมองเห็น (Sight) จากนั้นจึงนำผลการตรวจสอบมารวมเป็นคุณภาพรวมทั้งหมด ผู้ตรวจสอบจะต้องผ่านการฝึกหัด (Trained panel) จึงจะสามารถตรวจสอบคุณภาพได้แม่นยำทั้งในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ผลการตรวจสอบสามารถนำไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากวิธีการตรวจสอบคุณภาพทางอ้อม (Objective measurement) อื่นๆ ที่ใช้เครื่องมือวัด เช่น การตรวจสอบโดยวิธีทางจุลินทรีย์ และเคมี (นงลักษณ์ สุทธิวินิช, 2531)

3. วิธีทางจุลินทรีย์

แบคทีเรียสามารถติดเชื้อและเจริญอย่างรวดเร็วระหว่างที่ความสดลดลงโดยไม่แสดงอาการภายนอก เช่น กลิ่นคาว เหม็น เกิดเมือกเหนียวและอื่นๆออกมาให้เห็น ใช้การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count) โดยตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียเมื่อความสดลดลงมากหรือเริ่มเน่าเสีย แต่วิธีการนี้ใช้เวลานาน 24-48 ชั่วโมงกว่าจะทราบผลจึงไม่ใช่วิธีการที่เหมาะสมนัก

4. วิธีทางเคมี

4.1 การหาปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile base nitrogen, TVB-N)

การหาปริมาณ TVB-N เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดความสดของปลา TVB-N เกิดจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ภายหลังจากการตายของปลา ซึ่งจะเกิด

ไนโตรเจนที่ระเหยได้ ได้แก่ แอมโมเนีย Dimethylamine (DMA) และ Trimethylamine (TMA) จึงทำให้สามารถนำปริมาณของ TVB-N มาใช้เป็นค่าบ่งชี้ความสดของปลาได้ โดย Banks Nickelson และ Finne (1980) ได้กำหนดเกณฑ์ของปริมาณ TVB-N ในการบ่งบอกคุณภาพความสดของปลา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์ของปริมาณ TVB-N ในการบ่งบอกคุณภาพความสดของปลา

TVB-N (มิลลิกรัม N / ตัวอย่าง 100 กรัม)	ลักษณะปลา
< 12	ปลาสด
12-20	ปลาที่ยังบริโภคได้
20-25	ปลาที่เริ่มเน่าเสียแต่บริโภคได้
> 25	ปลาเน่าเสียบริโภคไม่ได้

ที่มา : Banks Nickelson และ Finne (1980)

การหาปริมาณ TVB-N นิยมใช้วิธี Conway's Method (Hasegawa, 1987) โดยใช้จาน Conway ที่มีลักษณะเป็นจานหลุมที่มีวงแหวนตรงกลางแบ่งหลุมด้านในจานเป็น 2 ส่วน คือวงแหวนด้านใน (Inner ring) และวงแหวนด้านนอก (Outer ring) หลักการของวิธี Conway's Method คือให้สารละลายใน Inner ring ของจาน Conway เป็น 1% Boric acid ที่ผสมอยู่กับ Mixed indicator (Bromocresol green และ Methyl red) ส่วน Outer ring จะใส่สารละลายปลาตัวอย่างที่สกัดโดย 4% TCA ก่อนแล้วใส่สารละลายอิมมัตว์ Potassium carbonate (K_2CO_3) มีผลทำให้สารประกอบต่างที่ระเหยได้ (Total volatile base) ในสารละลายปลาตัวอย่างถูกปลดปล่อยออกมาแล้วละลายใน Boric acid เกิด Boric acid salt ขึ้น Boric acid salt จะถูกรีดิวส์ได้โดยการลด Hydrochloric ระหว่างการไตเตรท หลังจากใส่สารละลายอิมมัตว์ Potassium carbonate แล้วจะเก็บจาน Conway ไว้ที่ 37 °C 60 นาที หรือ 30 °C 100 นาที หรือ 20 °C 120 นาที เพื่อให้สารประกอบต่างที่ระเหยได้ถูกปลดปล่อยออกมาแล้วละลายใน Boric acid จนหมด แต่วิธีการนี้ไม่สามารถบ่งบอกคุณภาพทางด้านความสดของปลาในระยะเริ่มแรกหลังการตายของปลาก่อนที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้

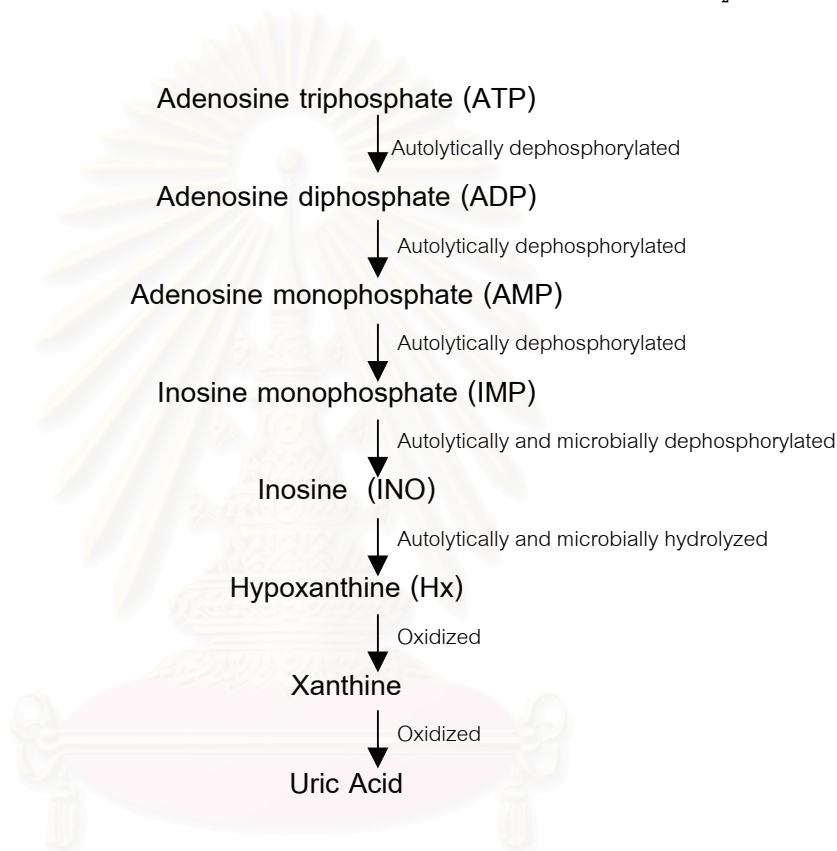
4.2 การหาปริมาณ Trimethylamine (TMA)

TMA เกิดจากการแตกตัวของ Trimethylamineoxide (TMAO) โดยการทำงานของแบคทีเรียในปลาสด ส่วนปลาที่แช่เยือกแข็ง TMAO จะแตกตัวได้เป็น Dimethylamineoxide (DMA) และ Formaldehyde โดยเอนไซม์จากทั้งในเนื้อปลาและแบคทีเรีย

การหาปริมาณ TMA ในการบ่งบอกคุณภาพความสดของปลามีการค้นคว้ากันอย่างมากมายพบว่า ปริมาณของ TMA จะขึ้นกับ species ของปลา สถานที่จับ ระยะของการเสื่อมคุณภาพ ลักษณะของที่เก็บรักษา และวิธีการวิเคราะห์ (Botta, 1995)

4.3 การหาปริมาณผลผลิตที่เกิดจากการสลายตัวของนิวคลีโอไทด์

นิวคลีโอไทด์ที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต คือ Adenosine triphosphate (ATP) หลังจากปลาตาย จะเกิดปฏิกิริยา Autolysis ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ ATP ในตัวปลา ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 การสลายตัวของนิวคลีโอไทด์ในปลา

ที่มา : Botta (1995)

การสลายของ ATP จนได้ IMP จะเกิดจากเอนไซม์ในธรรมชาติที่มีในเนื้อเยื่อของปลา โดยทั่วไปการสลายตัวดังกล่าวจะเกิดขึ้นภายใน 1 วัน ความเร็วของการสลายตัวของ ATP ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การดิ้นรนก่อนการตาย กระบวนการจับ และอุณหภูมิในการเก็บรักษา (Botta, 1995)

ส่วนการสลายตัวของ IMP จนได้ Hx จะเกิดทั้งจากขบวนการ Autolysis และเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์โดยจะเกิดอย่างช้าๆ การวัดความเข้มข้นของสารที่เกิดจากการสลายตัวของนิวคลีโอไทด์ใช้เป็นตัวบ่งบอกคุณภาพความสดของปลาในระยะเริ่มแรกของการเปลี่ยนแปลงหลังการ

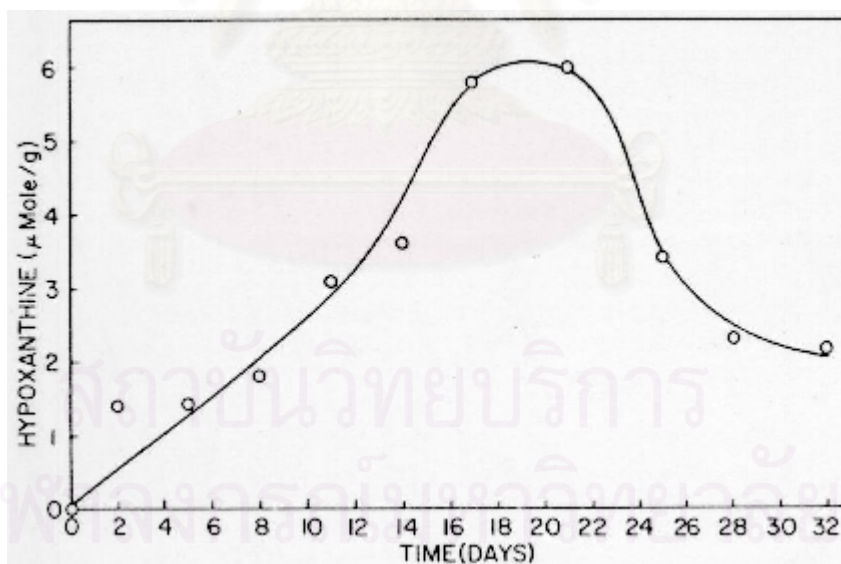
ตาย ในขณะที่การหาปริมาณ TMA และ TVB-N จะบ่งบอกคุณภาพความสดของปลาในระยะหลังของการสลายตัวของนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นช่วงการเปลี่ยนแปลงหลังการตายอันเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่

หลังจากปลาตาย การสลายตัวของ IMP จนได้ Hx จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ทำให้ปริมาณ Hx จะค่อยๆเพิ่มขึ้นหลังการตายและจะเกิดการสะสมของ Hx ขึ้นก่อนที่จะสลายตัวต่อไป

2.2 การวัดความสดของปลาโดยการหาปริมาณ Hypoxanthine (Hx)

ปริมาณ Hx จะเกิดจากการแตกตัวของนิวคลีโอไทด์สะสมเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เก็บจึงสามารถใช้เป็นค่าประเมินความสดในระยะแรกได้

Jahns และ Rand (1977) ได้ศึกษาปริมาณ Hx ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของปลา Whiting ที่เก็บไว้ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 0 °C พบว่าปริมาณ Hx จะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เมื่อ Hx เพิ่มขึ้นสูงสุด แล้วจะลดลงในเวลาต่อมาดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ของปริมาณ Hypoxanthine ในปลา whiting ที่เก็บไว้ในน้ำแข็งอุณหภูมิ

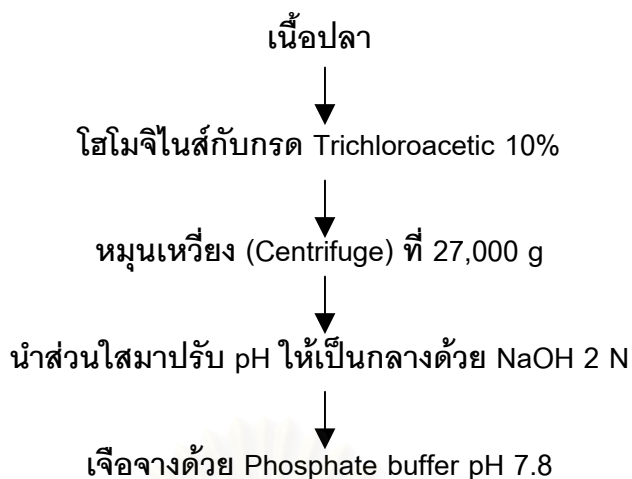
0 °C กับเวลาที่เก็บ

ที่มา : Jahns และ Rand (1977)

นอกจากนั้นยังมีการศึกษาในปลาชนิดอื่น เช่น ปลา Catfish, ปลา Red hake, ปลา Winter flounder (Jahns *et al.*, 1976; Beuchat, 1973) พบว่าปริมาณ Hx เพิ่มขึ้นและลดลงใน แนวนอนที่ใกล้เคียง แต่ปริมาณ Hx จะแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์น้ำ การดัดแปรก่อนการตาย กระบวนการจับ และอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา (Botta, 1995) ดังนั้น ปริมาณ Hx ที่จะใช้เป็นมาตรฐานในการบ่งบอกความสดได้จะต้องมีการศึกษาในสัตว์น้ำแต่ละชนิดอย่างเฉพาะเจาะจง รวมทั้งควบคุมสภาวะในการเก็บรักษาให้เป็นมาตรฐาน และพยายามให้ปัจจัยอื่น ๆ มีความสม่ำเสมอ และควรวัดควบคู่กับวิธีวัดความสดแบบอื่นๆ เช่น การวัดทางประสาทสัมผัส และการหาปริมาณ TVB-N เป็นต้น

Beuchat (1973) ได้เสนอวิธีการวัดความสดของปลาจากการหาปริมาณ Hx โดยนำ เอนไซม์ Xanthine oxidase (XO) ร่วมกับ Redox dye 2,6-dichlorophenolindophenol (DIP) ใส่ในสารสกัดปลาตัวอย่างที่เตรียมโดยนำเนื้อปลามาโฮมิจในสกับกรด Perchloric แล้วกรอง นำสารละลายมาปรับ pH ให้เป็นกลางโดยใช้ KOH เจือจางด้วย Phosphate buffer แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 604 nm ของสี DIP ที่เปลี่ยนไปจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ XO กับ Hx จากนั้นหาปริมาณ Hx โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐาน เมื่อทำการทดลองวัดปริมาณ Hx ในปลา Catfish ที่เก็บที่ 2 °C ควบคู่กับการทดสอบทางประสาทวิธี Hedonic scale โดยทดสอบคุณภาพทางด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่นของปลาสด และทดสอบคุณภาพทางด้านเนื้อสัมผัส รสชาติของปลาสด ผลการทดสอบคือ เมื่อเก็บปลา catfish ที่ 2 °C เป็นเวลามากกว่า 6 วัน คะแนนการทดสอบทางประสาททางด้านลักษณะปรากฏ และสียังอยู่ในระดับที่ดี แต่คะแนนทางด้านกลิ่น และการยอมรับรวม อยู่ในระดับที่ไม่ดี ในขณะที่คะแนนทางด้านเนื้อสัมผัส รสชาติไม่มีคะแนน ซึ่งผู้วิจัยรายงานว่าที่ระยะเวลาการเก็บดังกล่าวไม่สามารถทดสอบชิมเพื่อวัดผลด้านเนื้อสัมผัสและรสชาติได้ เพราะปลาเกิดการเน่าเสียอย่างเห็นได้ชัด โดยปริมาณ Hx ของปลา Catfish ที่เก็บที่ 2 °C เป็นเวลา 6 วันนั้นเท่ากับ 1.3 $\mu\text{mole/g}$ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าปริมาณ Hx ของปลา Catfish ที่เก็บที่ 2 °C ไม่ควรเกิน 1.3 $\mu\text{mole/g}$ จึงจะยังมีผลทางประสาทสัมผัสในระดับดีอยู่

Mulchandani Male และ Luong (1990) ได้เสนอวิธีการเตรียมสารสกัดจากปลาตัวอย่างที่ใช้กับเอนไซม์เซนเซอร์ในหาความสดของปลาในรูปของค่า Ki ซึ่งเป็นค่าผลรวมของ INO และ Hx ทหารด้วยผลรวมของ IMP INO และ Hx โดยมีวิธีการเตรียมรูปที่ 3 และเปรียบเทียบค่า Ki ที่ได้จากเอนไซม์เซนเซอร์ กับค่า Ki ที่หาได้จาก Spectrophotometer ซึ่งหาได้โดยนำสารละลายสกัดจากเนื้อปลาที่เจือจาง 40 เท่า ด้วย Phosphate buffer pH 7.8 มา 1 ml ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Xanthine oxidase 0.18 U ร่วมกับเอนไซม์ Nucleoside phosphorylase 0.036 U และเอนไซม์ Nucleotidase 1.5 U วัดค่า การดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของกรดยูริกที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้ง 3

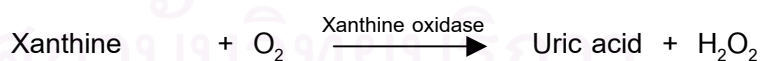


รูปที่ 3 วิธีการเตรียมสารสกัดจากปลาตัวอย่าง

ที่มา : Mulchandani และคณะ (1990)

2.3 เอนไซม์ Xanthine oxidase (XO)

เอนไซม์ Xanthine oxidase (xanthine : oxygen oxidoreductase; EC 1.1.3.22) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา Oxidation ของ Xanthine และ Hypoxanthine ไปเป็นกรด Uric ดังรูปที่ 4 พบมากในน้ำนมวัวและระดับของลูกวัว (Whitaker, 1972) เอนไซม์ Xanthine oxidase ที่บริสุทธิ์นิยมเตรียมจากน้ำนมวัว และจะใส่ EDTA เพื่อป้องกันเอนไซม์ในระหว่างทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และการเก็บรักษา (Zikakis, 1980)



รูปที่ 4 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase กับ Hypoxanthine

ที่มา : Watanabe และคณะ (1983)

การใช้เอนไซม์ XO ในรูปของสารละลายในการวัดความสดของปลานั้น จะสามารถวัดได้ครั้งเดียว ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงควรมีการใช้เอนไซม์ในรูปของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ในการวัดเพราะสามารถนำมาวัดซ้ำได้หลายครั้ง

2.4 การตรึงเอนไซม์ (Enzyme Immobilization)

การตรึงเอนไซม์ หมายถึง การทำให้เอนไซม์ถูกจำกัดหรือกักขังอยู่ในขอบเขตแน่นอนที่จัดไว้ เพื่อเป็นการรักษาแอกติวิตีในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไว้ ซึ่งจะมีผลทำให้เอนไซม์สามารถนำไปใช้ซ้ำได้หลายครั้งและต่อเนื่อง อาจทำให้เอนไซม์มีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมีหรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากหรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว กลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (Chibata, 1978)

ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป (Kennedy and Cabral, 1987)

1. สามารถนำเอนไซม์ไปใช้ซ้ำใหม่ได้
2. กระบวนการผลิตสามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่องและควบคุมได้ง่าย
3. สามารถแยกผลผลิต (Products) ออกมาได้ง่าย
4. มีโอกาสเพิ่มแอกติวิตีและเสถียรภาพของเอนไซม์ได้

ตัวพุง (Carrier) ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์จำเป็นต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ มีพื้นที่ผิวมาก มีผลทำให้เอนไซม์ติดบนตัวพุงมาก ส่งผลให้การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปสูงขึ้น (Chibata, 1978) ตัวพุงต้องไม่ละลายน้ำและสามารถให้สับเสตรผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในตัวพุงรวมทั้งให้ผลผลิตผ่านออกมาได้ และมีความทนทานต่อความร้อน ปฏิกริยาเคมี และแรงกลได้ มีรูปร่างและขนาดที่เหมาะสม และยังสามารถนำกลับไปใช้ใหม่ได้ (Kennedy and Cabral, 1987)

วิธีการตรึงเอนไซม์บนตัวพุง (Chibata, 1978)

1. วิธีการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method)

เป็นการดูดซับของเอนไซม์บนผิวภายนอกของตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำ วิธีการตรึงรูปโดยวิธีนี้จะไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างสามมิติและแอกติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากไม่มีพันธะเคมี และแรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงอ่อนมาก เอนไซม์อาจหลุดออกจากตัวพุงระหว่างการใช้งาน

2. วิธีเชื่อมแบบพันธะอิออนิก (Ionic binding method)

เป็นการเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงที่ไม่ละลายในสารละลายปฏิกิริยา โดยการแลกเปลี่ยนไอออนกันภายนอกโมเลกุลระหว่างเอนไซม์กับตัวพุง ในบางครั้งการเชื่อมกันของเอนไซม์กับตัวพุงไม่ได้เกิดเฉพาะพันธะอิออนิกอย่างเดียว แต่จะมีการดูดซับทางกายภาพเกิดขึ้นด้วย และลักษณะที่สำคัญของการตรึงรูปโดยวิธีเชื่อมพันธะอิออนิกคือ มีผลต่อแอกติวิตี และโครงสร้าง

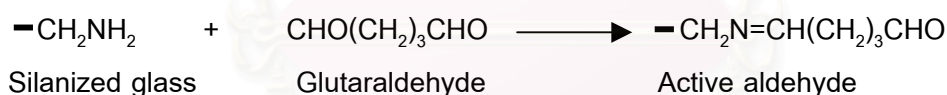
สามมิติน้อย ดังนั้นแอกติวิตีอาจจะคงเดิม แต่แรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงอ่อน เอนไซม์หลุดง่ายที่ความเข้มข้นของอิออน (Ionic strength) สูง หรือแรงเกาะกันจะลดลงเมื่อเปลี่ยน pH

3. วิธีเชื่อมแบบพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method)

การเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนต์ เป็นวิธีที่มีการนำมาศึกษา มากที่สุด พันธะโควาเลนต์เป็นพันธะที่แข็งแรง ทำให้แรงเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงแข็งแรง เอนไซม์จะไม่หลุดจากตัวพยุงได้ง่ายระหว่างการทำปฏิกิริยากับสับสเตรท หรือในสภาวะที่สารละลายมีความเข้มข้นของอิออนสูง แต่ปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนต์ในการตรึงเอนไซม์ค่อนข้างรุนแรง จึงมีผลโดยตรงต่อบริเวณเร่ง (Active site) และโครงร่างสามมิติของเอนไซม์ ผลกระทบดังกล่าวมีทั้งช่วยทำให้แอกติวิตีสูงและลดลงได้ทั้ง 2 กรณี ขึ้นอยู่กับภาวะการตรึงรูปที่ได้ทดลอง

การเชื่อมพันธะโควาเลนต์ ด้วยสาร Bifunctional reagents

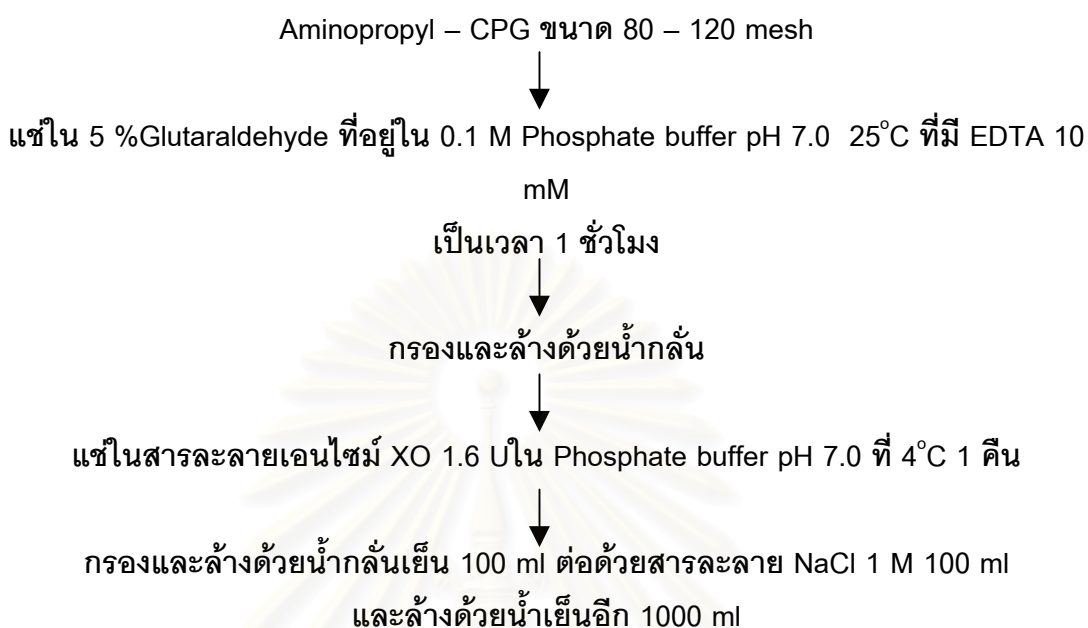
การเชื่อมขวางระหว่างตัวพยุงและเอนไซม์ด้วยสารเชื่อมขวาง (Cross-linkers) ซึ่งจะเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของตัวพยุง และหมู่ อะมิโน ของเอนไซม์ สารเชื่อมขวางอาจเป็นพวก Bifunctional reagents (หมู่ 2 หมู่ ทำหน้าที่เดียวกัน) หรือพวก Multi-bifunctional reagents (หมู่ มากกว่า 2 หมู่ ทำหน้าที่เดียวกัน) ตัวอย่างสาร Bifunctional reagent ที่รู้จักกันแพร่หลาย เช่น Glutaraldehyde มีหมู่ Aldehyde 2 หมู่ ที่สามารถเชื่อมกับหมู่ อะมิโน ของตัวพยุงและเอนไซม์ ด้วยวิธีการสร้าง Schiff base ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 การตรึงเอนไซม์ด้วย Glutaraldehyde

ที่มา : Kilara และ Shahani (1979)

Shintani และคณะ (1994) ได้เสนอวิธีการตรึงเอนไซม์ XO บน Aminopropyl – Controlled pore glass (CPG) โดยใช้ Glutaraldehyde มีวิธีการตรึงดังนี้

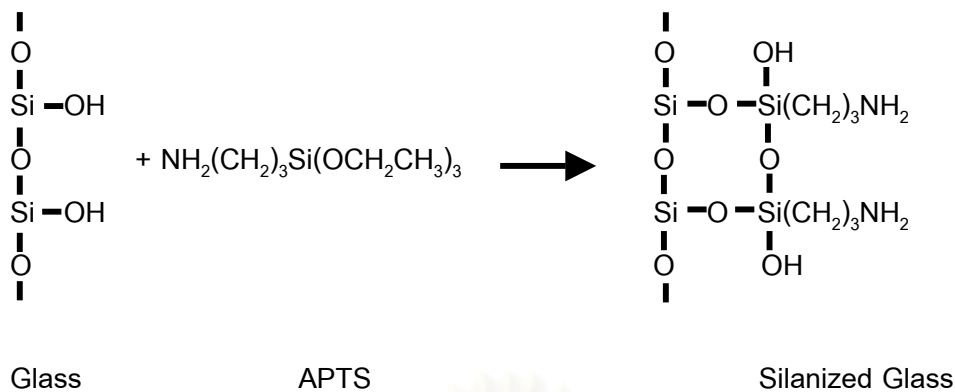


รูปที่ 6 วิธีการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase

ที่มา : Shintani และคณะ (1994)

Aminopropyl - CPG เป็น CPG (Controlled-pore glass) ที่มีหมู่อะมิโนอยู่บนผิว เมื่อแช่ใน Glutaraldehyde ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์มีสมบัติเป็นสาร Bifunctional สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่ อะมิโนบนผิวของ propyl - CPG และเมื่อนำ Aminopropyl - CPG ไปแช่ในสารละลายเอนไซม์ XO ในเวลาต่อมา Glutaraldehyde ที่อยู่บนผิวของ Aminopropyl - CPG ก็จะเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ XO เอนไซม์ XO ก็จะถูกตรึงอยู่บนผิวของ Aminopropyl - CPG

นอกจากการใช้ Aminopropyl - CPG แล้วยังสามารถตรึงเอนไซม์บน CPG ได้ แต่ CPG ต้องผ่านการทำ Silanization โดยใช้ Aminopropyltriethoxysilane (APTS) ก่อนเพื่อเป็นการกระตุ้นให้ผิวของ CPG มีหมู่อะมิโน การทำ Silanization เป็นดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 การทำ Silanization บน CPG

ที่มา : Weetall (1976)

Janowski และคณะ (1991) ศึกษาวิธีการทำ Silanization กับ Porous glass โดยเปรียบเทียบตัวทำละลายของ APTS 3 ชนิดคือ น้ำ Toluene และ Acetone พบว่าการนำสารละลาย APTS ที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาณ 150 ml และ Porous glass 12 g เขย่า 2 ชั่วโมง ที่ 80 °C กรองและล้างด้วยน้ำ 300 ml อบแห้ง 2 ชั่วโมง ที่ 110 °C หลังจากนั้นนำ Porous glass ที่ผ่านการทำ Silanization นี้ไปตรึงเอนไซม์ Glucoamylase โดยใช้ Glutaraldehyde จะได้แอกติวิตีของเอนไซม์ Glucoamylase ตรึงรูปที่สูงกว่าเอนไซม์ Glucoamylase ตรึงรูปที่ใช้ Porous glass ที่ผ่านการทำ Silanization โดยใช้ตัวทำละลายของ APTS คือ Toluene และ Acetone เนื่องจากการใช้ Toluene และ Acetone เป็นตัวทำละลายของ APTS ในการทำ Silanization กับ Porous glass จะให้หมู่อะมิโนบนผิวของ Porous glass ที่หนาแน่นเกินไปทำให้เอนไซม์ถูกตรึงบน Porous glass ได้น้อย

2.5 ชูริมิ

ชูริมิ คือ เนื้อปลาที่ผ่านการแยกก้างออก บด แล้วล้างด้วยน้ำ กำจัดน้ำบางส่วนออก นำมาบดให้ละเอียด ผสมวัตถุดิบอาหาร เช่น น้ำตาล ฟอสเฟต อาจนำเอาชูริมิที่ได้ไปทำผลิตภัณฑ์เลย หรืออาจเก็บเอาไว้ในรูปแช่เยือกแข็งเพื่อแปรรูปต่อไปได้ สิ่งที่ต้องการในการผลิต ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูปจากชูริมิก็คือ ความเหนียว (Gel strength) ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับชนิดของปลา ความสด และเทคนิคในการผลิตชูริมิ ในการผลิตชูริมิในระดับอุตสาหกรรม วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตชูริมิควรมีลักษณะพื้นฐาน คือ วัตถุดิบควรจะสามารถจับได้ในปริมาณที่เพียงพอตลอดทั้งปี วัตถุดิบจะต้องสด เพราะความสดของปลาเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุดต่อคุณภาพของชูริมิ วัตถุดิบ

ควรจะมีราคาต่ำ เพราะการผลิตซูริมิ จะต้องใช้ปลาในปริมาณมากโดยจะได้ผลผลิตทั้งหมดเพียง 15-30 %จากน้ำหนักของปลาทั้งหมด การผลิตซูริมิในประเทศไทยนิยมใช้ปลาทรายแดง ปลาตาหวาน ปลาจวด เนื่องจากมีปริมาณมากและราคาถูก (สุเชษฐ์ สมุหเสนีโต, 2535)

ปลาทรายแดง (*Nemipterus* spp.)

ปลาทรายแดง เป็นปลาทะเลที่มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Threadfin bream มีมากมายหลายชนิด ชนิดที่พบมากในประเทศไทยได้แก่ *Nemipterus hexodon* *Nemipterus furcosus* *Nemipterus japonicus* และ *Nemipterus peronii* ตามครีบบมีลักษณะเป็นเส้นสายเล็กๆ มีลำตัวสั้นป้อม ด้านข้างแบน เกล็ดมีขนาดเล็ก และเป็นชนิดที่มีริมเป็นหยัก เส้นข้างตัวมีเส้นเดี่ยวติดต่อกัน ที่แก้มมีเกล็ดขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่นๆ ครีบหลังมีครีบเดี่ยว ส่วนครีบหางเว้าลึกเป็นแฉก ขนาดของปากค่อนข้างเล็ก ชอบอาศัยตามพื้นท้องทะเลที่มีทรายปนโคลน หรือตามสถานที่ที่อยู่ใกล้ปะการัง มีอยู่ในอ่าวไทยแถบจังหวัดชลบุรี ระยอง ตราด บัตตานี (หน่วยสำรวจแหล่งประมง, 2516) ปลาทรายแดงสามารถจับได้ปริมาณมากในแต่ละปี โดยในปี 2539 สามารถจับได้ถึง 89,592 ตัน (กลุ่มสถิติและสารสนเทศการประมง, 2542) เนื้อปลาทรายแดงมีสีขาว รสชาติดี มีความสามารถในการเกิดเจลสูง มี Myofibrillar protein ที่ทนต่อสภาวะแช่เยือกแข็งในการเก็บรักษาได้ดี ทำให้ได้ซูริมิที่มีคุณภาพสูง (Holmes, Noguchi and Mcdonal, 1992)

ปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*)

ปลาตาหวาน หรือปลาตาโตเป็นปลาทะเลที่มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Bigeye เป็นปลาที่พบมากในอ่าวไทย พบชุกชุมตั้งแต่หัวหินจนถึงสงขลา รวมทั้งด้านมหาสมุทรอินเดีย จะอยู่รวมกันเป็นฝูงหากินตามพื้นท้องทะเล ปลาขนาดเล็กหาเลี้ยงตัวตามชายฝั่ง เป็นปลากินเนื้อ อาหารส่วนใหญ่คือพวกกุ้ง และปลาขนาดเล็ก สำหรับปลาขนาดใหญ่พบแพร่กระจายในบริเวณน้ำลึกมากกว่าน้ำตื้น ตั้งแต่ 40-50 เมตร จับได้มากตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม ส่วนใหญ่จับได้ด้วยอวนลาก มีราคาถูก (ปริญญาก สุชะวิสิษฐ์ และเพ็ญแข ชื่นจิตต์ผ่อง, 2525) ปลาตาหวานสามารถจับได้ปริมาณมากใกล้เคียงกับปลาทรายแดง ในปี 2539 สามารถจับได้ถึง 82,122 ตัน (กลุ่มสถิติและสารสนเทศการประมง, 2542) เนื้อปลาตาหวานมีสีคล้ำเล็กน้อยแต่มีความสามารถในการเกิดเจลสูง (Holmes, Noguchi and Mcdonal, 1992)

ขั้นตอนในการผลิตซูริมิ (Toyoda et al., 1992)

การผลิตซูริมิในอุตสาหกรรมมีขั้นตอนหลักๆดังต่อไปนี้

1. การล้างทำความสะอาด เมื่อรับวัตถุดิบปลามาแล้ว ก่อนการผลิตต้องมีการล้างทำความสะอาดปลาเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนต่างๆ เช่น โคลน ทราาย และจุลินทรีย์ที่ติดมากับปลา การล้างน้ำ ควรใช้น้ำผสมคลอรีนที่มีอุณหภูมิ 9-10
2. การเตรียมวัตถุดิบ นำปลามาตัดหัวควักไส้ และล้างทำความสะอาดอีกครั้งเพื่อกำจัดเลือด และเอ็นไซม์จากทางเดินอาหาร
3. การแยกเนื้อ ปลาที่ผ่านการเตรียมวัตถุดิบและล้างน้ำแล้วจะนำมาทำการแยกเนื้อออกโดยใช้เครื่อง Deboner ซึ่งอาศัยหลักในการบีบอัดเนื้อปลาผ่านตะแกรงที่มีรูขนาดเล็ก (3.5-4 มม.) ทำให้ก้างปลาและหนังติดอยู่กับแผ่นตะแกรง ส่วนเนื้อก็สามารถลอดออกมาได้
4. การล้างน้ำ นำเนื้อปลาล้างน้ำ 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการออก เช่น ไขมัน หนัง เลือด กลิ่นผิดปกติ และโปรตีนที่ละลายในน้ำออก ในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญมากที่สุดในการผลิตซูริมิ ซึ่งจะมีผลต่อความเหนียวของผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยสังเกตได้จากตารางที่ 2 พบว่าค่าความเหนียวของเจลซูริมิที่ไม่ได้ผ่านการล้างน้ำจะลดลงต่ำกว่าซูริมิที่ผ่านการล้างน้ำแล้ว ในระหว่างการล้างน้ำจะต้องรักษาอุณหภูมิของน้ำไม่ให้เกิน 10 °C การล้างแต่ละครั้งไม่ควรใช้เวลาเกิน 15 นาที และควรกำจัดน้ำในแต่ละครั้งออกให้มากที่สุด
5. การกำจัดสิ่งปนเปื้อน เนื้อปลาที่ผ่านการล้างน้ำแล้วจะผ่านขั้นตอนการกำจัดเศษก้างเกล็ด อวัยวะภายใน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เหลือออก โดยเข้าเครื่อง Refiner
6. การกำจัดน้ำออก เนื้อปลาจะเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดน้ำออกให้เหลือความชื้นประมาณ 85% โดยน้ำหนัก
7. การสับผสม นำเนื้อปลามาเข้าเครื่องสับผสม (Silent cutter) โดยเติมสารโครีโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) ได้แก่ สารฟอสเฟต น้ำตาล และซอพิทอล เพื่อรักษาคุณภาพของโปรตีนไว้เมื่อผ่านการแช่เยือกแข็ง ในระหว่างการสับผสมเนื้อปลาจะเกิดความร้อนจากแรงเสียดทานขึ้น ดังนั้นเนื้อปลาและเครื่องจักรควรทำให้เย็นก่อนจะทำการผลิต
8. การแช่เยือกแข็ง นำเนื้อปลาที่ได้บรรจุในถุงโพลีเอทิลีนขนาด 10 กิโลกรัมต่อหน่วยทำการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -25 °C

ผลของความสดของปลาต่อคุณภาพซูริมิ

ความสดของปลามีความสำคัญอย่างมากต่อคุณภาพของซูริมิ ซูริมิที่มีคุณภาพสูงไม่มีทางที่จะผลิตได้จากปลาที่ไม่มีความสดไม่ว่าเทคโนโลยีการผลิตจะดีเพียงใด โดยจะสังเกตได้จากตารางที่ 2 พบว่าเมื่อความสดของปลา Alaska pollock ลดลง จะส่งผลให้ค่าความเหนียวของเจลซูริมิ (Gel strength) ลดลงด้วย ความสดของปลาลดลงเนื่องมาจากการเสื่อมสภาพจากปฏิกิริยา

ของเอนไซม์ในตัวปลาเอง และจากแบคทีเรีย ทำให้โปรตีนในเนื้อปลาเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ ทำให้ความสามารถในการเกิดเจลลดลง เนื่องจากความสามารถในการละลายของ Myofibrillar protein ในสารละลายเกลือลดลง ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ต้องการในซูริมิ คือ ความยืดหยุ่น ความเหนียว ที่ดีสูญหายไป (วราทิพย์ สมบุญญฤทธิ, 2531)

ตารางที่ 2 ค่าความเหนียวของเจลซูริมิ (Gel strength) ที่ทำจากปลา Alaska pollock ที่ระดับความสดต่างๆ

	Fish condition (Day of storage at 5 °C)			
	Extremely fresh (0 day)	Very fresh (2 days)	Fairly fresh (4 days)	Not fresh (6 days)
	Gel strength (g.cm)			
Unleached surimi	1100	600	350	150
Leached surimi	1200	850	650	400

ที่มา : Uno และ Nakamura (1958)

บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุประสงค์

ปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) และปลาทรายแดง 2 พันธุ์คือ *Nemipterus hexodon* และ *Nemipterus furcosus* ซึ่งจากสะพานปลาแม่กลอง จังหวัดสมุทรสงคราม ขนส่งมายังห้องทดลองโดยทางรถยนต์ ขณะขนส่งใส่ปลาในถังพลาสติกที่หุ้มฉนวนกันความร้อน และรักษาความสดด้วยน้ำแข็งบดอุณหภูมิ 0 - 4 °C ขนส่งมาถึงห้องทดลองใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง เริ่มการทดลองทันทีเมื่อมาถึง ปลาทั้ง 3 ชนิดมีน้ำหนักเฉลี่ยตัวละประมาณ 200 กรัม มีอายุหลังการจับประมาณ 3 - 5 วัน (จากการสอบถาม) จับได้โดยใช้เรืออวนลาก (กลุ่มสถิติและสารสนเทศ การประมง, 2542)

สารเคมี

เอนไซม์ Xanthine oxidase Grade 1 สกัดได้จาก Buttermilk ของบริษัท Sigma Chemical ขนาด 50 U (1 U ของเอนไซม์จะเปลี่ยน Xanthine 1 μ mole ไปเป็น Uric acid ภายใน 1 นาทีที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 25 °C) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C

Hypoxanthine	AR grade
Aminopropyltriethoxysilane	AR grade
Glutaraldehyde	AR grade
Trichloroacetic acid	AR grade
Potassium dihydrogen phosphate	AR grade
Sodium hydroxide	AR grade
Boric acid	AR grade
Bromocresol green	AR grade
Methyl red	AR grade
Potassium carbonate	AR grade
Hydrochloric acid	AR grade
Nitric acid	AR grade

เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

เม็ดแก้วกลมขนาด 2 มม. ของบริษัทวิทยาศาสตร์

เศษแก้ว ได้จากส่วนแก้วใสที่ไม่มีตัวพิมพ์ของบิกเกอร์ชนิด Pyrex

หลอดทดลองฝาเกลียวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มม. ยาว 150 มม.

เครื่องเขย่าแบบตะแกรงร่อน (Type vibro, Retsch)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Jasco, V530)

เครื่องชั่งหยาบ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Satorius, BP3100S)

เครื่องชั่งหยาบ ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius, A200S)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Horiba, F-21E)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิช่วง 3 – 90 °C สามารถเขย่าได้ (DT Hetotherm, CB60)

เครื่องเขย่า (Thermolyne/Sybron, M4 9120-26)

เตาอบลมร้อน (WTB Binder, E53)

เครื่องหมนเหวี่ยง (Heraeus, Christ)

เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer, TA-XT2i)

จานคอนเวย์ (Sibata)

ไมโครบิวเรต (Sibata)

เครื่องปั่นสารละลาย (Waring blender, 32BL79)

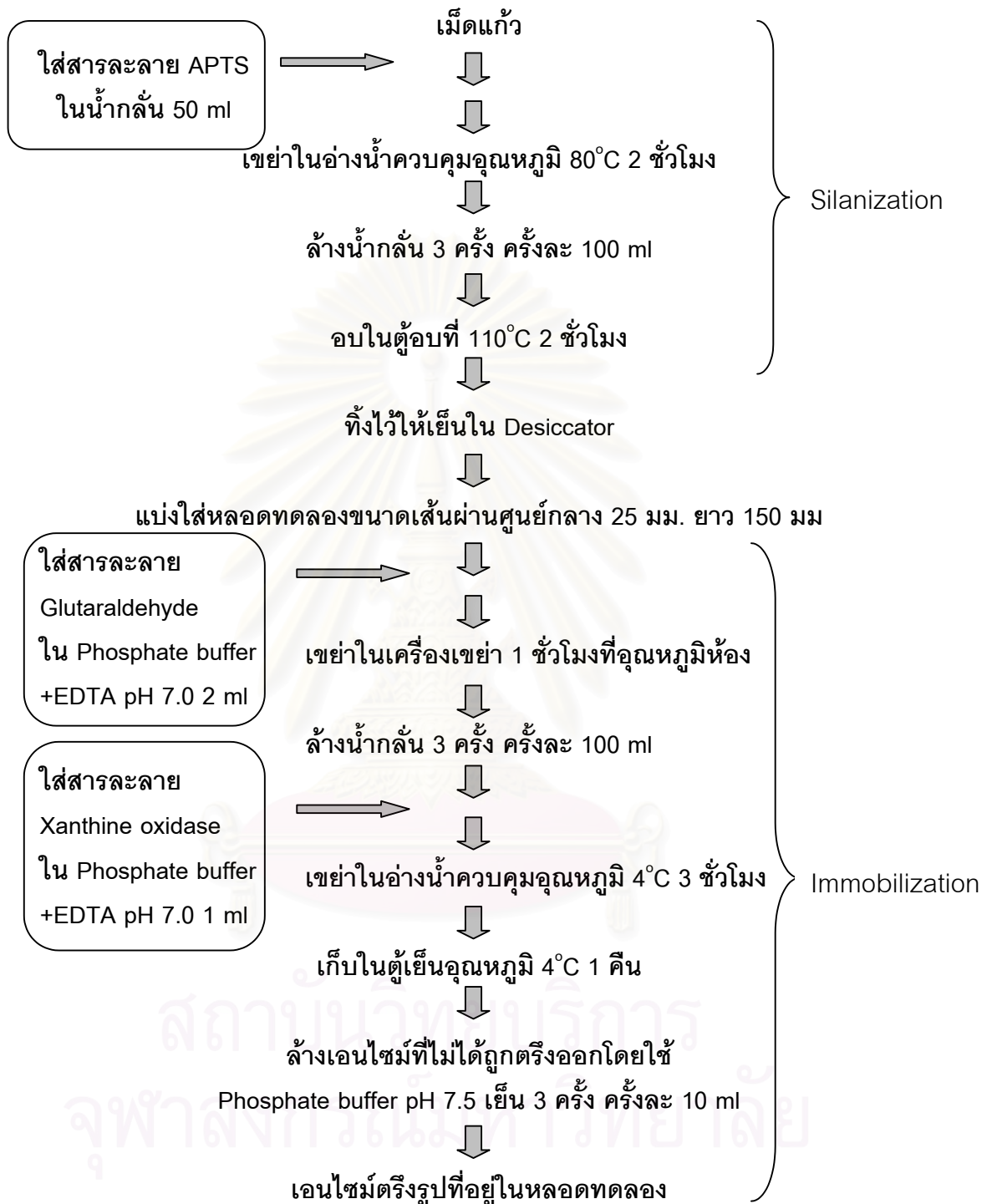
เครื่องบดเนื้อปลา (Braun, 4259)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการทดลอง

3.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวของเม็ดแก้ว

ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือการทำ Silanization ด้วย Aminopropyltriethoxysilane (APTS) เพื่อเปลี่ยนหมู่ OH ของเม็ดแก้วให้กลายเป็นหมู่อะมิโน ใช้วิธีของ Janowski และคณะ (1991) ขั้นตอนที่ 2 คือการตรึง (Immobilization) เอนไซม์ Xanthine oxidase ด้วย Glutaraldehyde ซึ่งเป็นสารเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนบนโมเลกุลของเอนไซม์กับหมู่อะมิโนบนเม็ดแก้วด้วยพันธะโควาเลนต์ ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Shintani และคณะ (1994) โดยการล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงออกจะใช้ Phosphate buffer pH 7.5 ล้าง 3 ครั้ง แทนการใช้น้ำเย็นร่วมกับสารละลาย NaCl ขั้นตอนที่ 3 เป็นไปดังรูปที่ 8 เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ 9 ได้นำไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ดังขั้นตอนในรูปที่ 9



รูปที่ 8 ขั้นตอนการทำ Silanization ของเม็ดแก้ว และการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวของเม็ดแก้ว

ที่มา : Janowski และคณะ (1991) ; Shintani และคณะ (1994)



รูปที่ 9 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตริงรูป

ศึกษาภาวะต่างๆที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวของเม็ดแก้ว ดังต่อไปนี้

3.1.1 ขนาดของเม็ดแก้ว

แปรขนาดของเม็ดแก้ว 2 ขนาดคือขนาด 2 มม. และขนาด 50-140 mesh (เส้นผ่านศูนย์กลาง 106 - 300 ไมโครเมตร ซึ่งหาได้จากรายละเอียดที่แสดงไว้ด้านข้างของตะแกรงร่อน) ก่อนการทดลองนำเม็ดแก้วทั้ง 2 ขนาดมาล้างให้สะอาดด้วยวิธีของ Swaisgood Huang และ Walsh (1997) โดยการต้มเม็ดแก้วในกรด Nitric เข้มข้น 1:4 (v/v) ที่อุณหภูมิ 95 -100 °C แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง อบจนแห้งที่อุณหภูมิ 105 °C

นำเม็ดแก้วขนาด 2 มม. 50 กรัม ใส่ใน Flask ขนาด 250 ml จากนั้นทำตามขั้นตอนในรูปที่ 8 โดยการทำ Silanization จะใช้สารละลาย APTS เข้มข้น 10%(v/v) ปริมาตร 50 ml ซึ่งเป็นปริมาตรที่ท่วมเม็ดแก้วพอดี เมื่ออบเม็ดแก้วจนแห้งและทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงแบ่งเม็ดแก้วใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มม. ยาว 150 มม. หลอดละ 5.0 กรัมซึ่งเป็นปริมาณที่มากที่สุดที่ใส่ในหลอดทดลองแล้วสามารถเขย่าเม็ดแก้วในสารละลายให้เคลื่อนที่ได้ทั่วถึง ส่วนการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase นั้นจะใช้สารละลาย Glutaraldehyde เข้มข้น 5%(v/v) 2 ml ใช้สารละลายเอนไซม์ Xanthine oxidase เข้มข้น 0.40 U/ml และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปตั้งขั้นตอนในรูปที่ 9

เม็ดแก้วขนาด 50-140 mesh (106-300 ไมโครเมตร) เตรียมได้โดยทุบเศษแก้วที่ได้จากส่วนแก้วใสที่ไม่มีตัวพิมพ์ของบิกเกอร์แตกให้ละเอียดแล้วร่อนให้ได้ขนาดตามต้องการด้วยเครื่องเขย่าแบบตะแกรงร่อน ล้างเม็ดแก้วที่ร่อนแยกได้ให้สะอาดด้วยวิธีของ Swaisgood Huang และ Walsh (1997) แล้ว จึงนำเม็ดแก้ว 20 กรัม ใส่ใน Flask ขนาด 250 ml จากนั้นทำตามขั้นตอนในรูปที่ 8 โดยการทำ Silanization และการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase จะใช้สารละลาย APTS สารละลาย Glutaraldehyde และสารละลายเอนไซม์ Xanthine oxidase ที่มีความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันกับที่ใช้ในเม็ดแก้วขนาด 2 มม. แตกต่างกันที่ปริมาณเม็ดแก้วที่ใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มม. ยาว 150 มม. จะแบ่งใส่หลอดละ 2.00 กรัม เพราะเป็นปริมาณที่มากที่สุดที่ใส่ในหลอดทดลองแล้วสามารถเขย่าเม็ดแก้วในสารละลายให้เคลื่อนที่ได้ทั่วถึง ส่วนการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปทำตามขั้นตอนในรูปที่ 9

เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วทั้ง 2 ขนาด วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3.1.2 ความเข้มข้นของ Aminopropyltriethoxysilane (APTS) และ Glutaraldehyde

แปรความเข้มข้นของ APTS 3 ระดับคือ 2.0 5.0 และ 10.0 %(v/v) และแปรความเข้มข้นของ Glutaraldehyde 2 ระดับคือ 3.0 และ 5.0 %(v/v) ทำการทดลองตามขั้นตอนในรูปแบบที่ 8 ใช้ขนาดของเม็ดแก้วที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.1 แบ่งเม็ดแก้วที่ทำ Silanization แล้วใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2.00 กรัม ใช้สารละลายเอนไซม์ Xanthine oxidase เข้มข้น 0.40 U/ml และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปตามวิธีการดังรูปที่ 9

เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูป วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 3x2 ทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.1.3 ปริมาณเม็ดแก้ว

แปรปริมาณเม็ดแก้วที่ผ่านการทำ Silanization แล้วใส่ในหลอดทดลอง 3 ระดับคือ 1.00 2.00 และ 3.00 กรัม ทำการทดลองตามขั้นตอนในรูปแบบที่ 8 ใช้ขนาดของเม็ดแก้วที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.1 ใช้ความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde ที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.2 ใช้สารละลายเอนไซม์ Xanthine oxidase เข้มข้น 0.40 U/ml และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปตามวิธีการดังรูปที่ 9

เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูป วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.1.4 ความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase

แปรความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase ที่ใช้ในการตรึง 4 ระดับคือ 1.0 2.0 4.0 และ 6.0 U/ml ทำการทดลองตามขั้นตอนในรูปแบบที่ 8 ใช้ขนาดของเม็ดแก้วที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.1 ใช้ความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde ที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.2 ใช้ปริมาณเม็ดแก้วที่ทำ Silanization แล้วใส่หลอดทดลองในปริมาณที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.3 และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปตามวิธีการดังรูปที่ 9

เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ตรีงรูป วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.1.5 วิธีการล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึง

แปรวิธีการล้างเอนไซม์ออกเป็น 3 วิธี คือ

- ก. ล้างด้วย Phosphate buffer pH 7.5 เย็นครั้งละ 10 ml 0 - 10 ครั้ง
- ข. ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็นครั้งละ 10 ml 0 - 10 ครั้ง
- ค. ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็นครั้งละ 10 ml 2 ครั้ง สารละลาย NaCl 1 M เย็นครั้งละ 10 ml 0 - 10 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นเย็นครั้งละ 10 ml 10 ครั้ง (ดัดแปลงจากวิธีของ Shintani และคณะ (1994))

ทำการทดลองตามขั้นตอนในรูปที่ 8 ใช้ขนาดของเม็ดแก้วที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.1 ใช้ความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde ที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.2 ใช้ปริมาณเม็ดแก้วที่ทำ Silanization แล้วใส่หลอดทดลองในปริมาณที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.3 ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase ที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.4 และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูปตามวิธีการดังรูปที่ 9 เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของกรด Uric ที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรีงรูปจากการล้างทั้ง 3 วิธี

เปรียบเทียบการล้างเอนไซม์ที่ตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้กับการล้างเอนไซม์ที่ตรึงด้วย Physical adsorption และพันธะอิกอนิกที่มีวิธีการทำโดย นำเม็ดแก้วสะอาด 2.00 กรัม มาใส่หลอดทดลองใส่สารละลายเอนไซม์ Xanthine oxidase ใน Phosphate buffer +EDTA pH 7.0 1 ml ใช้ความเข้มข้นตามที่เลือกแล้วจากข้อ 3.1.4 เขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 4°C 3 ชั่วโมง เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C 1 คืน ล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงออกโดยใช้การล้างทั้ง 3 วิธี เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรีงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์นี้กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของเอนไซม์ตรีงรูปที่ตรึงด้วย Physical adsorption

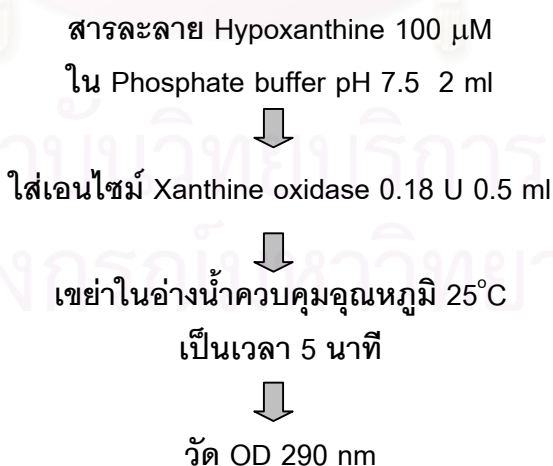
ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบผลของการล้างจากแผนภูมิความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ กับจำนวนครั้งของการล้าง

3.2 ศึกษาสมบัติ ความคงตัว และอายุการใช้งานของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

3.2.1 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

นำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ผ่านการตรึงโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 และเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ 0.05 U ปริมาตร 0.5 ml (มีปริมาณโปรตีนเท่ากับเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry) มาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในรูปของค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH 5.0 - 9.5 โดยการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปทำตามวิธีการดังรูปที่ 9 ส่วนการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระทำตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Mulchandani Male และ Luong (1990) ดังรูปที่ 10 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หา pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระจากแผนภูมิความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระกับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทำปฏิกิริยา ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์มีสูตรดังนี้

$$\text{ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH ใดๆ} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่ pH นั้น}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตร ณ pH ที่ให้ค่าสูงที่สุด}} \times 100$$



รูปที่ 10 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ

ที่มา : Mulchandani Male และ Luong (1990)

3.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

นำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ผ่านการตรึงโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 และเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระ 0.05 U ปริมาตร 0.5 ml (มีปริมาณโปรตีนเท่ากับเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry) มาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในรูปของค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 15 – 45 °C โดยการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปทำตามวิธีการดังรูปที่ 9 ส่วนการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระทำตามวิธีการดังรูปที่ 10 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระจากแผนภูมิความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระกับอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา

ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์มีสูตรดังนี้

$$\text{ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิใดๆ} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่อุณหภูมินั้น} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตร ณ อุณหภูมิที่ให้ค่าสูงที่สุด}}$$

3.2.3 ความคงตัวต่อการทำปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

นำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ผ่านการตรึงตามภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 มาทดสอบการทำปฏิกิริยาซ้ำโดยนำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปมาวัดแอกติวิตีตามวิธีการดังรูปที่ 9 ใช้ภาวะของการทำปฏิกิริยา คือ ใช้ pH ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1 และใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 อุณหภูมิคือ 25 30 และ 35 °C หลังจากวัดแอกติวิตีครั้งแรกแล้ว นำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปมาล้างโดยใช้น้ำกลั่นเย็นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 ml จากนั้นนำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปมาวัดแอกติวิตีซ้ำอีกครั้ง จะวัดแอกติวิตีซ้ำจนกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปจะต่ำกว่า 0.100 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบจำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิทั้ง 3 จากแผนภูมิความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์กับจำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 °C

ทำการทดลองหาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปในแต่ละครั้งที่ทำปฏิกิริยาซ้ำ โดยนำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปมาวัดแอกติวิตี 1 ครั้ง 2 ครั้ง 3 ครั้ง 4 ครั้ง และ 5 ครั้ง ใช้ภาวะของการทำปฏิกิริยา คือ ใช้ pH ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1 และใช้ อุณหภูมิ 25 °C นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ได้ไปหาค่า Initial activity และนำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่วัดแอกติวิตีแล้วนี้ ไปหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry ตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่า Initial activity กับปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป จากแผนภูมิความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและ %Initial activity กับจำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิ 25 °C
ค่า Initial activity หาได้จากสูตร

$$\text{ค่า Initial activity} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่วัดได้} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่วัดได้ครั้งแรก}}$$

ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry ที่ทำในการทดลองข้างต้นว่าสามารถวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเอนไซม์ Xanthine oxidase ที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้วได้หรือไม่ โดยนำเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป ใส่ในหลอดทดลอง ปริมาณ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 กรัม ใส่สารละลาย HCl 0.2 N 1 ml ในหลอดทดลอง เขย่าแล้วทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้กรด HCl ไปทำลายพันธะโควาเลนต์ที่ตรึงเอนไซม์อยู่ นำไปทำให้เป็นกลางด้วยสารละลาย NaOH 2 N แล้วใส่ Lowry reagent 1.0 ml ผสมแล้วทิ้งไว้ 10 นาที ใส่ 0.5 ml Folin reagent ผสมอย่างรวดเร็ว ทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ที่ได้กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ที่ได้จากเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ใส่น้ำกลั่น 1 ml แทนการใส่สารละลาย HCl ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm แบบจับคู่โดยวิธี t test (Paired – samples t test)

3.2.4 อายุการเก็บรักษาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

เก็บเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป และเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ (มีปริมาณโปรตีนเท่ากับเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry) ไว้ใน Phosphate buffer pH 7.0 ที่มี EDTA 10 mM ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน ในระหว่างการ

เก็บวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปตามวิธีการดังรูปที่ 9 และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์อิสระตามวิธีการดังรูปที่ 10 ที่ pH ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1 และที่อุณหภูมิที่ได้จากข้อ 3.2.3 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่า Initial activity ของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ จากแผนภูมิความสัมพันธ์ระหว่างค่า Initial activity กับระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ หาค่า Initial activity จากสูตรในข้อ 3.2.3

3.2.5 ลักษณะพื้นผิวของเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปเมื่อถ่ายภาพด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM)

นำเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ผ่านการตรึงโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 มาทำแห้งด้วยวิธี Freeze dry โดยนำเม็ดแก้วเปียกที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำหลอดทดลองไปจุ่มใน Ethanol อุณหภูมิ -20 °C ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เม็ดแก้วเปียกที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปกลายเป็นน้ำแข็ง จากนั้นนำไปต่อเข้ากับเครื่อง Freeze dry ประมาณ 1 ชั่วโมง จะได้เม็ดแก้วแห้งที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป นำเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเม็ดแก้วสะอาดมาถ่ายภาพด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) เพื่อดูลักษณะของพื้นผิว

3.3 การตรวจวัดปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และปลาตาหวาน โดยใช้เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

3.3.1 ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์ และปลาตาหวานที่เก็บไว้ในน้ำแข็ง

เก็บรักษาปลาไว้ในน้ำแข็งบดอุณหภูมิ 0 – 4 °C ที่บรรจุในถังพลาสติกที่หุ้มด้วยฉนวนกันความร้อนตลอดการทดลอง วิเคราะห์วันเว้นวัน โดยชும்ปลามา 3 ตัว นำปลาแต่ละตัวมาเตรียมสารสกัดปลาตัวอย่างและหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาแต่ละตัวด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ โดยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Mulchandani Male และ Luong (1990) ดั้งเดิมตอนในรูปที่ 11 การเจือจางสารสกัดจากปลาจะใช้ Phosphate buffer ที่ pH ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1 จำนวนเท่าของการเจือจางจะขึ้นกับความสดของปลา โดยปลาที่มีความสดมากจะเจือจาง 10 เท่า และปลาที่เริ่มเน่าเสียจะเจือจาง 16 เท่า เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.1 – 0.3



รูปที่ 11 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดปลาตัวอย่างและหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ

คำนวณปริมาณ Hypoxanthine (Hx) จากสูตร

$$\text{ปริมาณ Hypoxanthine } (\mu\text{mole/g}_{\text{sample}}) = \frac{(\text{ODs} - \text{ODb}) \times \text{Dilution} \times V_{\text{TCA}}}{\text{Slope} \times W_s \times 1000}$$

ODs คือ ค่า OD290nm ของสารสกัดปลาหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์

ODb คือ ค่า OD290nm ของสารสกัดปลา

Dilution คือ จำนวนเท่าที่เจือจางด้วย Phosphate buffer pH 8.0

Slope คือ ความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย Hypoxanthine

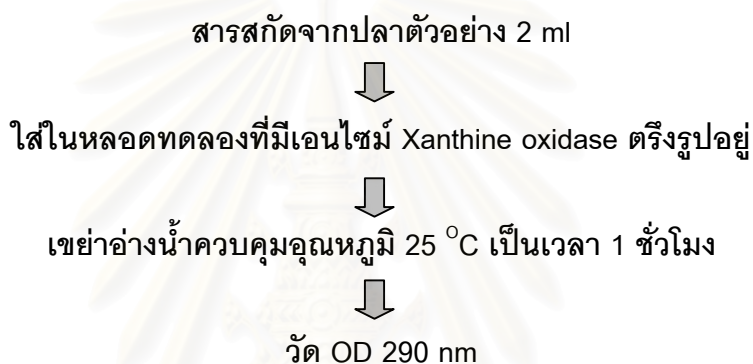
V_{TCA} คือ ปริมาณของ Trichloroactic acid ที่ใช้ (25ml)

W_s คือ น้ำหนักของเนื้อปลาดตัวอย่าง

จากสูตรการหาปริมาณ Hypoxanthine มีหลักการคือ เมื่อนำสารสกัดจากปลา มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Xanthine oxidase เอนไซม์จะเปลี่ยน Hypoxanthine ในสารสกัดจาก ปลาให้กลายเป็นกรด Uric จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ในสาร สกัดจากปลาหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้ว และนำค่าที่ได้มาลบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นา โนเมตรของกรด Uric ในสารสกัดจากปลาที่มีอยู่ก่อนทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ก็จะได้ค่าการดูดกลืน แสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นา โนเมตรที่ได้นี้มาหารกับความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย Hypoxanthine ที่แสดง ในภาคผนวก ก็จะได้ปริมาณ Hypoxanthine ในสารสกัดจากปลาที่มีหน่วยเป็น μmole ต่อ 1 ลิตร ของสารสกัดจากปลา นำปริมาณ Hypoxanthine ที่ได้นี้คูณกับจำนวนเท่าที่เจือจางด้วย Phosphate buffer และคูณกับปริมาณของ Trichloroactic acid ที่ใช้แล้วหารด้วย 1000 จะได้ ปริมาณ Hypoxanthine ที่อยู่ใน Trichloroactic acid ที่ใช้ในการสกัดเนื้อปลา เมื่อนำปริมาณ Hypoxanthine นี้หารด้วยน้ำหนักของเนื้อปลาดตัวอย่าง จะได้ปริมาณ Hypoxanthine ที่มีหน่วย เป็น $\mu\text{mole/g}_{\text{sample}}$

3.3.2 เปรียบเทียบปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงกับเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระของเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์ และเนื้อปลาทาหวาน

ทำการทดลองหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และเนื้อปลาทาหวานด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปดังรูปที่ 12 ควบคุมการหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดงและปลาทาหวานด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระในข้อ 3.3.1 คำนวณปริมาณ Hypoxanthine (Hx) จากสูตรในข้อ 3.3.1 และเปรียบเทียบปริมาณ Hypoxanthine ที่หาด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด



รูปที่ 12 ขั้นตอนการหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase
ตรงรูป

3.3.3 ความคงตัวต่อการทำปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูป เมื่อใช้กับสารสกัดจากปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* และ ปลาทาหวาน

ขณะทำการทดลองหาปริมาณ Hypoxanthine ด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปในข้อ 3.3.2 นำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปที่ทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากปลาแล้วมาทำปฏิกิริยาซ้ำอีก 6 ครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์แล้วคำนวณหาค่า Initial activity จากสูตรในข้อ 3.2.3

3.4 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ Hypoxanthine กับลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB-N ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความเหนียวของเจล (Gel Strength) จากเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และปลาตาหวาน

วิเคราะห์ความสดของปลาทรายแดง 2 พันธุ์คือ *Nemipterus hexodon* และ *Nemipterus furcosus* รวมทั้งปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) โดยวัดระดับคุณภาพของลักษณะทางกายภาพ (Branch and Vail, 1985) วัดค่า TVB-N โดย Conway's Method (Hasegawa, 1987) วัดปริมาณจุลินทรีย์ (ICMSF, 1974) และเตรียมซูริมิ (สุเชษฐ์ สมุหเสนีโต, 2535) รวมทั้งตรวจสอบคุณภาพของซูริมิ (ดัดแปลงจากวิธีของสถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ (2541) และวิธีของสุเชษฐ์ สมุหเสนีโต (2535)) โดยการวัดค่าความเหนียว (Gel Strength) ด้วยเครื่อง Texture Analyzer (TA-XT2i) ควบคู่กับการหาปริมาณ Hypoxanthine ในข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวของเม็ดแก้ว

4.1.1 ขนาดของเม็ดแก้ว

จากผลการทดลองในตารางที่ 3 พบว่า เม็ดแก้วขนาด 50-140 mesh (เส้นผ่านศูนย์กลาง 106-300 μm) มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรโดยประมาณมากกว่าเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มม.มาก และเมื่อนำไปใช้ตรึงเอนไซม์แล้ววัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปโดยใช้สารละลาย Hypoxanthine ใน Phosphate buffer pH 7.5 เป็น Substrate พบว่าจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์สูงกว่าการใช้เม็ดแก้วขนาด 2 มม. ในการตรึงเอนไซม์ รวมทั้งยังใช้เม็ดแก้วขนาด 50-140 mesh ในปริมาณที่ต่ำกว่าเม็ดแก้วขนาด 2 มม. ดังนั้นจึงเลือกใช้เม็ดแก้วขนาด 50-140 mesh ใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3 ขนาดของเม็ดแก้วที่มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

ขนาดของเม็ดแก้ว	ปริมาณเม็ดแก้วที่ใช้ (กรัม)	พื้นที่ผิวต่อปริมาตรของเม็ดแก้วโดยประมาณ ($\text{mm}^2 / \text{mm}^3$)	ค่า OD 290 nm
2 มม.	5.0	3.00	0.174 ± 0.016
50-140 mesh (106-300 μm)	2.00	$(2.00 - 5.66) \times 10^4$	0.425 ± 0.018

4.1.2 ความเข้มข้นของ Aminopropyltriethoxysilane(APTS) และ Glutaraldehyde

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 เมื่อวิเคราะห์ห้ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 3x2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test พบว่าความเข้มข้นของ APTS และความเข้มข้นของ Glutaraldehyde มีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase โครงสร้างที่แสดงในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยความเข้มข้นของ APTS 10.0 %(v/v) และความเข้มข้นของ Glutaraldehyde 5.0 %(v/v) เป็นความเข้มข้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นที่ความเข้มข้นของ APTS 10.0 %(v/v) และความเข้มข้นของ Glutaraldehyde 5.0 %(v/v) จึงเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase จึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวสำหรับทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde ที่มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase โครงสร้าง

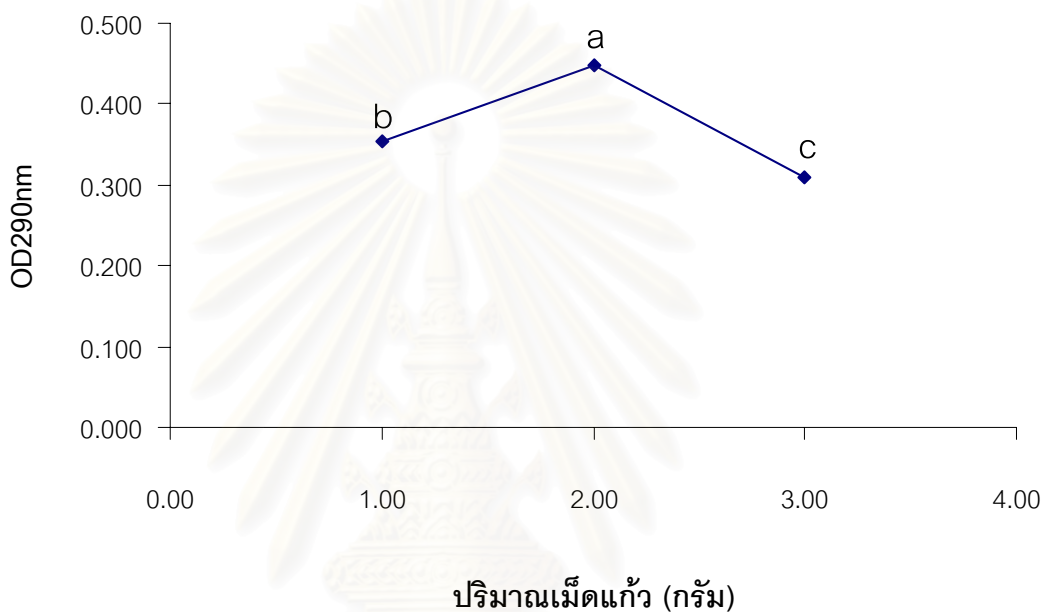
ความเข้มข้นของ APTS (%)	ความเข้มข้นของ Glutaraldehyde (%)	OD 290 nm *
2.0	3.0	0.333 ± 0.010 ^b
	5.0	0.337 ± 0.011 ^{ab}
5.0	3.0	0.338 ± 0.011 ^{ab}
	5.0	0.325 ± 0.005 ^b
10.0	3.0	0.332 ± 0.008 ^b
	5.0	0.359 ± 0.005 ^a

a,b,c ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

* ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

4.1.3 ปริมาณเม็ดแก้ว

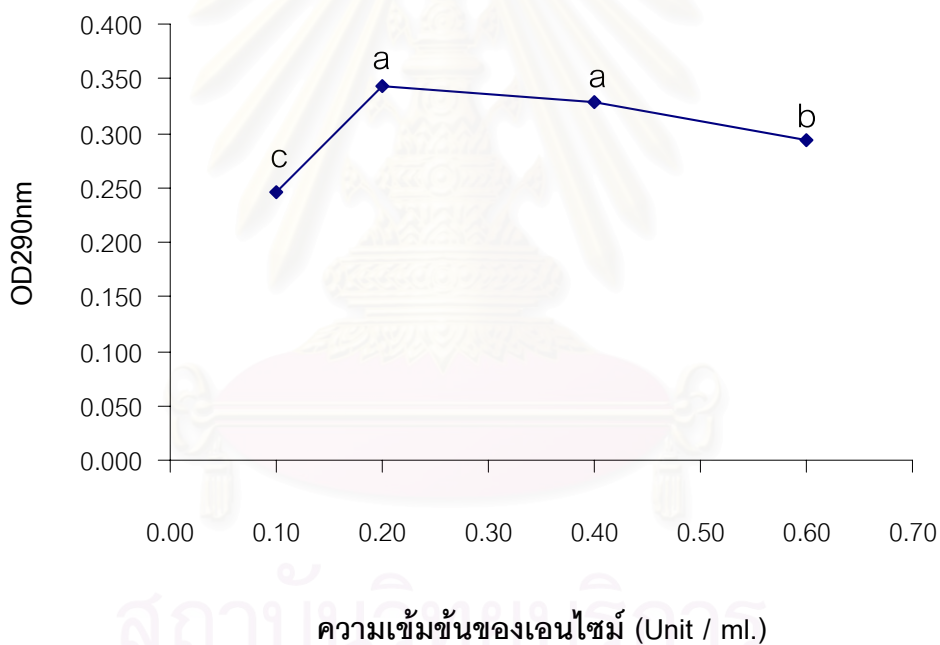
จากผลการทดลองที่แสดงรูปที่ 13 พบว่าการใช้เม็ดแก้วปริมาณ 2.00 กรัมในการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ ที่สูงกว่าการใช้เม็ดแก้วปริมาณ 1.00 กรัม และ 3.00 กรัม อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จึงเลือกปริมาณเม็ดแก้ว 2 กรัม สำหรับทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์กับปริมาณเม็ดแก้ว
a,b,c จุดที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.1.4 ความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase

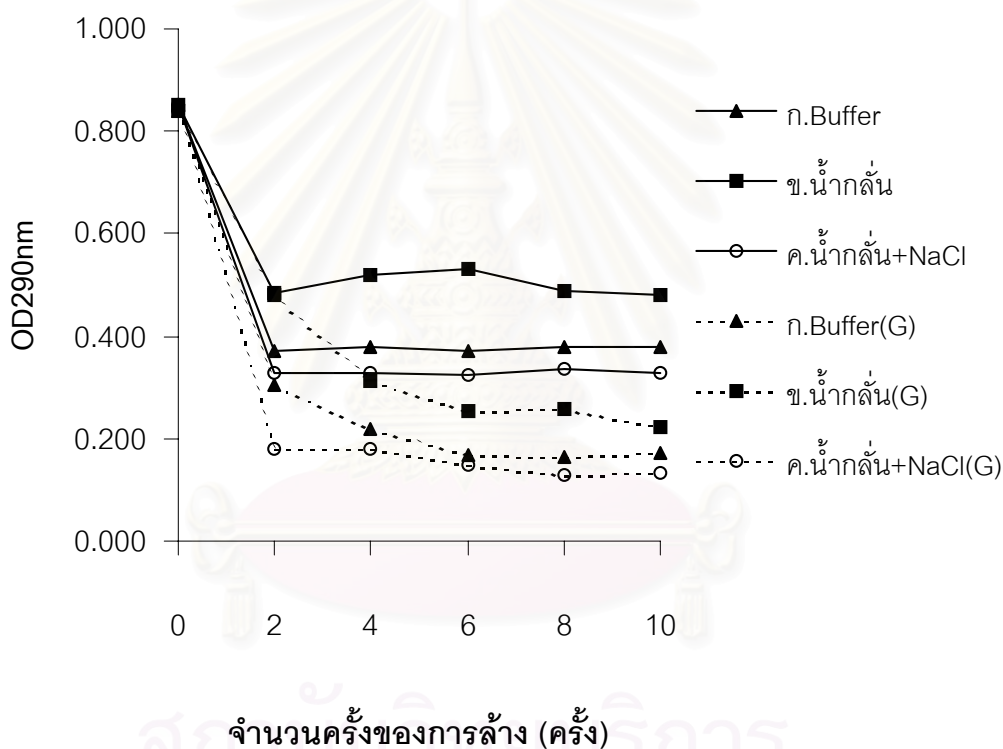
จากผลการทดลองที่แสดงรูปที่ 14 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase ในการตรึงเอนไซม์ เพิ่มขึ้นจาก 0.10 U/ml เป็น 0.20 U/ml จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.20 U/ml เป็น 0.40 U/ml พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.40 U/ml จนถึง 0.60 U/ml พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase 0.20 U/ml ทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์กับความเข้มข้นของเอนไซม์
a,b,c,d จุดที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.1.5 วิธีการล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึง

จากผลการทดลองที่แสดงรูปที่ 15 พบว่า การล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึง 2-10 ครั้ง ไม่ได้ทำให้เอนไซม์หลุดออกไปมากขึ้น โดยดูได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ และการล้างเอนไซม์ออกด้วยน้ำกลั่นเย็นจะเหลือเอนไซม์อยู่บนเม็ดแก้วมากที่สุด เมื่อเทียบกับการล้างเอนไซม์ออกด้วย Phosphate buffer pH 7.5 เย็นและการล้างเอนไซม์ออกด้วยน้ำกลั่นเย็นร่วมกับสารละลาย NaCl เย็นจึงเลือกวิธีการล้างเอนไซม์ออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เป็นวิธีการล้างที่เหมาะสมที่สุด

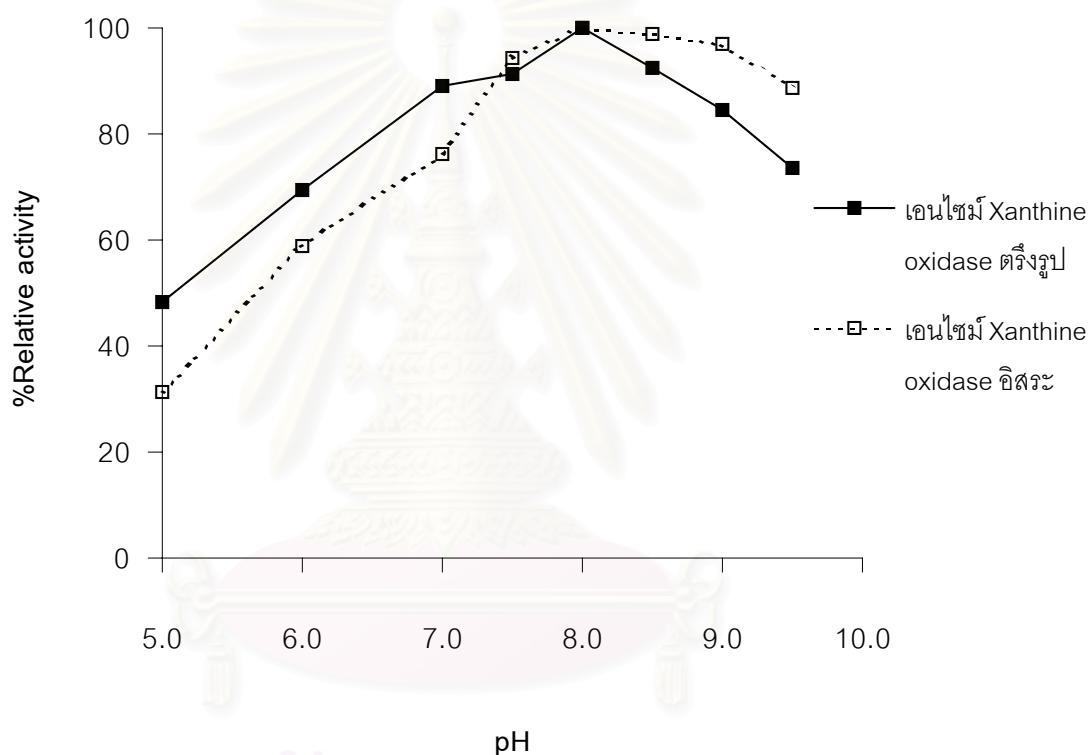


รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ กับจำนวนครั้งของการล้าง
เมื่อ G คือ เม็ดแก้วสะอาดที่ไม่ได้ผ่านกรรมวิธีใดๆเข้าไปในสารละลายเอนไซม์ Xanthine oxidase

4.2 ศึกษาสมบัติ ความคงตัว และอายุการใช้งานของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

4.2.1 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

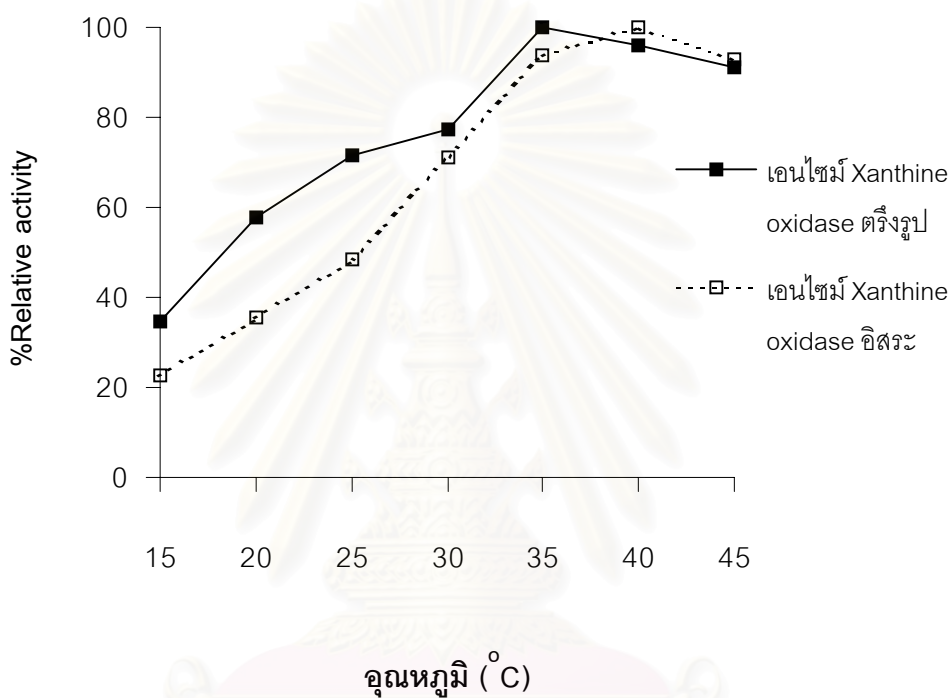
จากผลการทดลองที่แสดงรูปที่ 16 พบว่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปเท่ากับของเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระคือที่ 8.0



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระกับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทำปฏิกิริยา

4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

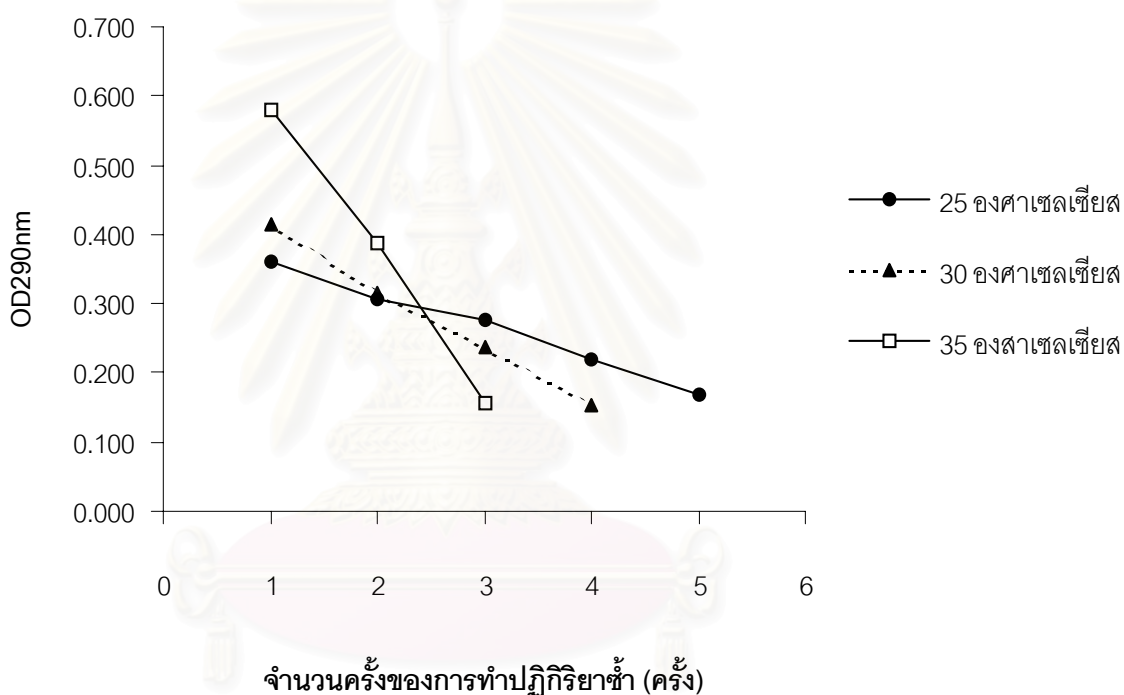
จากผลการทดลองที่แสดงรูปที่ 17 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปเท่ากับ 35 °C ซึ่งแตกต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระที่เท่ากับ 40 °C



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระกับอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา

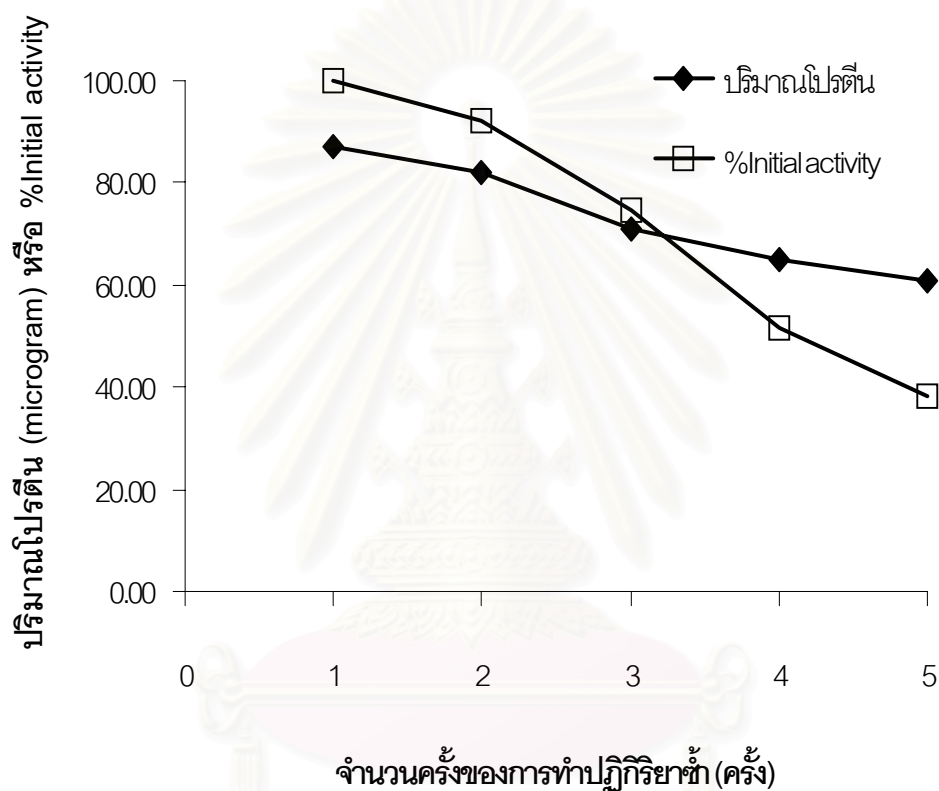
4.2.3 ความคงตัวต่อการทำปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

จากการทดลองนำเอนไซม์ Xanthine oxidase มาวัดแอกติวิตีซ้ำที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 °C พบว่าที่อุณหภูมิ 35 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปนั้น จะให้จำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C ในขณะที่อุณหภูมิ 25 °C ให้จำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำมากที่สุด จึงเลือกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 25 °C ใช้ในการทดลองในขั้นตอนนี้ต่อไป



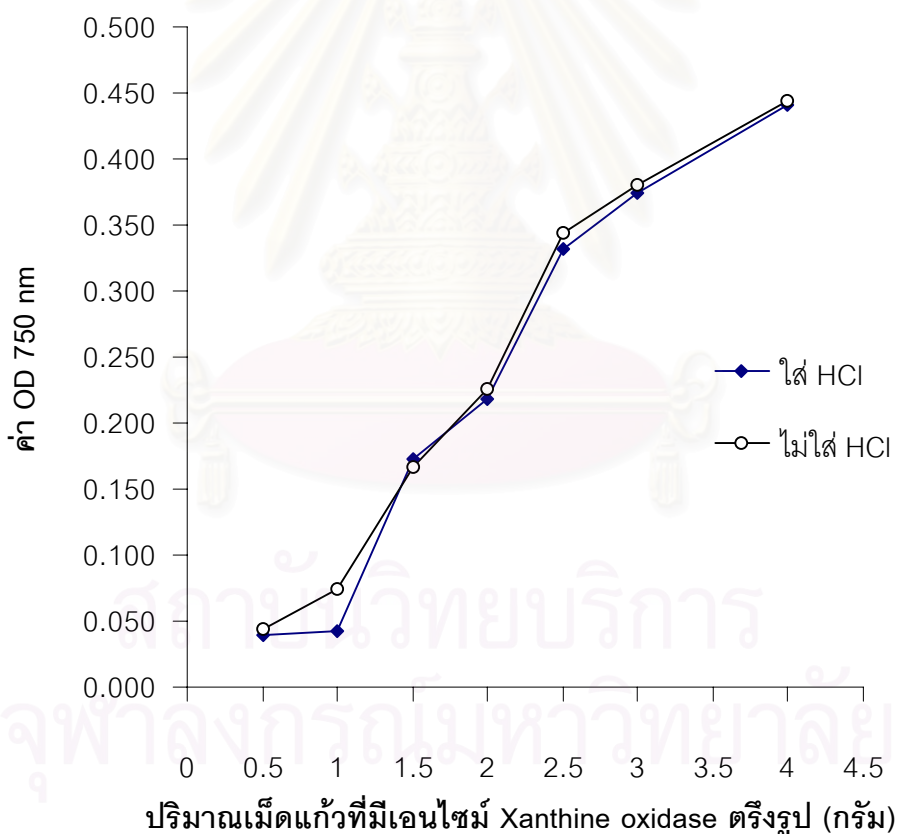
รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์กับจำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 °C

จากผลการทดลองที่แสดงรูปที่ 19 เมื่อนำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตีรังรูปมา ทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิที่ 25 °C แล้วนำไปหาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตีรังรูปหลังการทำปฏิกิริยาซ้ำ พบว่าการทำปฏิกิริยาซ้ำ 5 ครั้งทำให้ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตีรังรูปลดลงจาก 87 µg เป็น 62 µg กล่าวคือประมาณ 25 µg และแอกติวิตีของเอนไซม์ตีรังรูปที่แสดงในรูปของค่า Initial activity จะลดลงจากค่า Initial activity ของการทำปฏิกิริยาซ้ำครั้งแรก ถึง 60 %



รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตีรังรูปและ %Initial activity กับจำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิ 25 °C

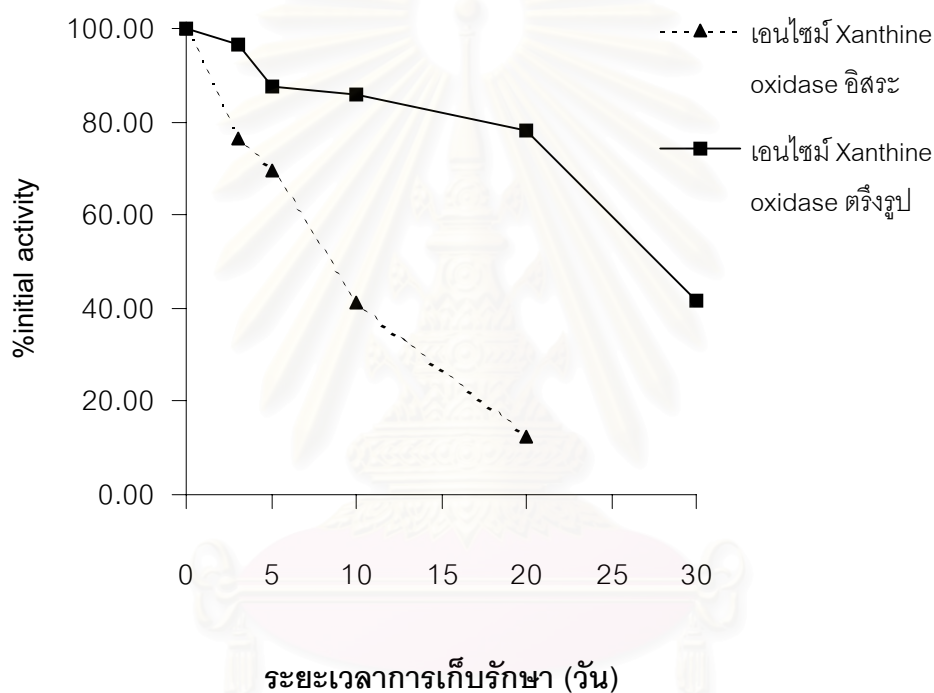
ในการหาปริมาณโปรตีนข้างต้นได้ใช้วิธีของ Lowry จึงได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเอนไซม์ Xanthine oxidase ที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้ว โดยใช้เม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป ปริมาณ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 กรัม และทำการทดลองเปรียบเทียบกรณีใส่และไม่ใส่สารละลาย HCl พบว่าเมื่อปริมาณเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ที่ได้จะมีค่าสูงขึ้นเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 20 และเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ที่ได้จากเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ใส่สารละลาย HCl ซึ่งจะไปทำลายพันธะโควาเลนต์ที่ตรึงเอนไซม์อยู่ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ที่ได้จากเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ไม่ใส่สารละลาย HCl พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นั้นแสดงว่าการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry ที่ทำในการทดลองข้างต้นที่ไม่ได้ใส่สารละลาย HCl สามารถวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเอนไซม์ Xanthine oxidase ที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้วได้



รูปที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm กับปริมาณเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry

4.2.4 อายุการเก็บรักษาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

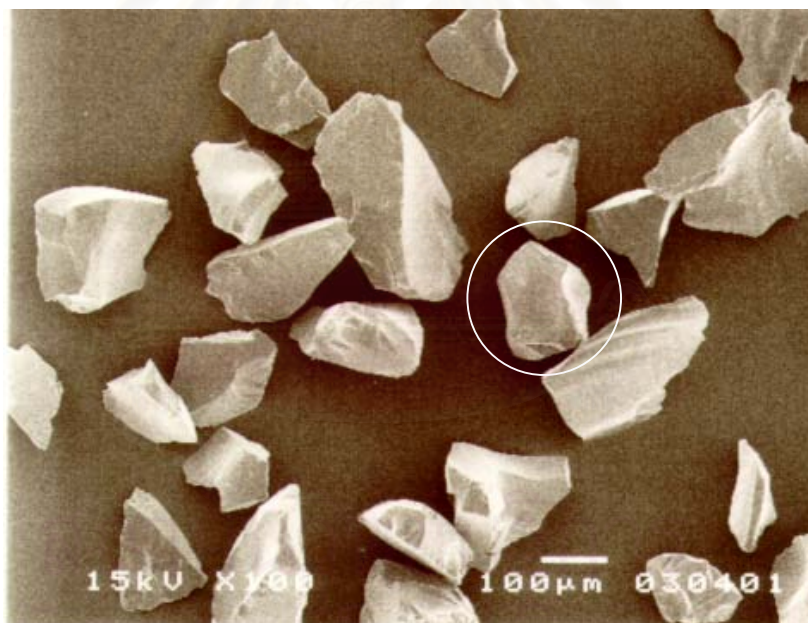
เมื่อเก็บเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาประมาณ 20 วัน ค่า Initial activity ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปจะลดลงประมาณ 20 % ในขณะที่ค่า Initial activity ของเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระจะลดลงถึง 90 % แสดงว่าเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปจะมีความคงตัวในการเก็บรักษา มากกว่าเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ



รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่าง % Initial activity กับระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ

4.2.5 ลักษณะพื้นผิวของเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปเมื่อถ่ายภาพด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM)

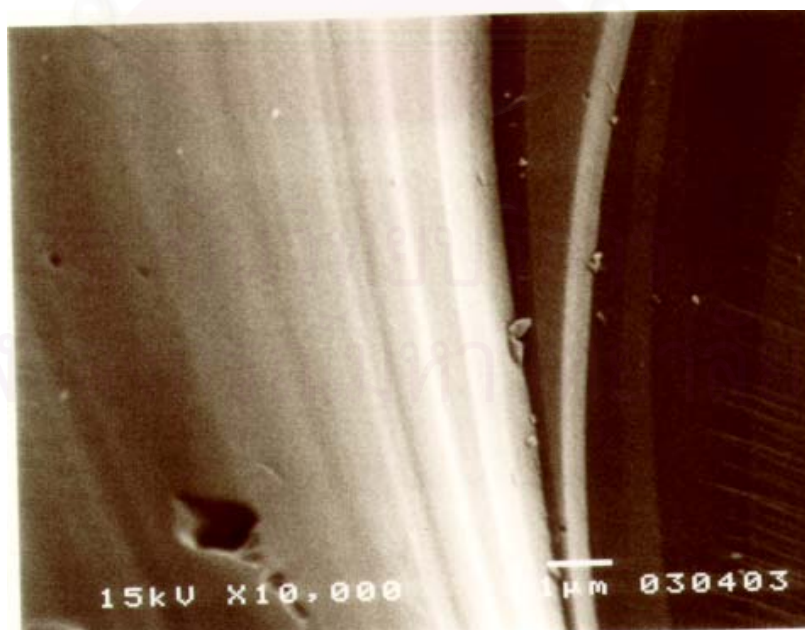
เมื่อนำเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเม็ดแก้วสะอาดมาถ่ายภาพด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) พบว่า เม็ดแก้วสะอาดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 106-300 μm ที่กำลังขยาย 100 เท่ามีลักษณะดังรูปที่ 22 ส่วนในรูปที่ 23 และรูปที่ 24 เป็นรูปของเม็ดแก้วที่อยู่ภายในวงกลมของรูปที่ 22 เมื่อถ่ายภาพที่กำลังขยาย 750 เท่า และ 10,000 เท่า ตามลำดับ จะเห็นว่าลักษณะพื้นผิวเม็ดแก้วสะอาดจะเรียบ ไม่มีสิ่งใดเกาะอยู่ในขณะที่เม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ถ่ายภาพที่กำลังขยาย 10,000 เท่าในรูปที่ 25 บนพื้นผิวของเม็ดแก้วจะมีลักษณะเป็นจุดๆ สีขาวกระจายอยู่ทั่วไป และเมื่อถ่ายภาพที่กำลังขยาย 35,000 เท่าในรูปที่ 26 จะพบเม็ดกลมๆ และสิ่งที่มีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจเป็นลักษณะของโปรตีนเอนไซม์ที่ติดอยู่บนผิวเม็ดแก้ว



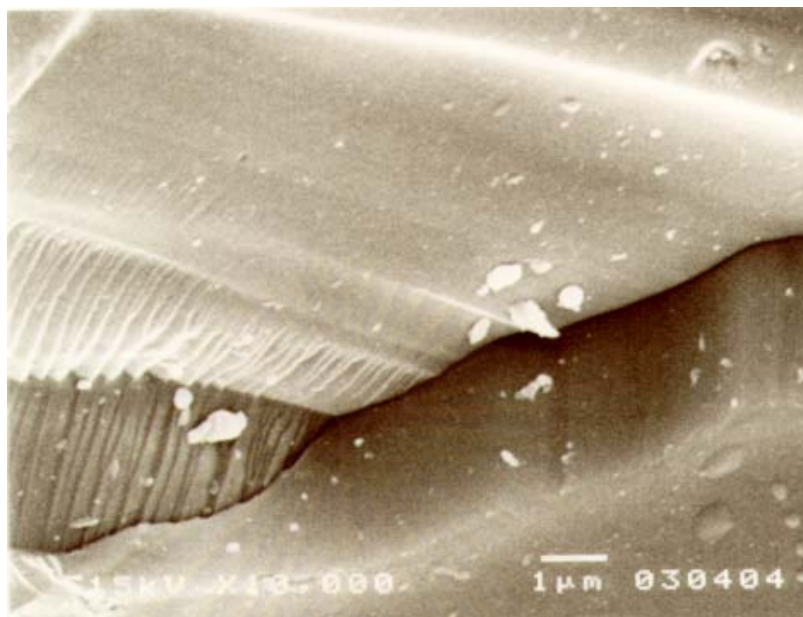
รูปที่ 22 ภาพถ่ายเม็ดแก้วสะอาดกำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 23 ภาพถ่ายเม็ดแก้วสะอาด กำลังขยาย 750 เท่า



รูปที่ 24 ภาพถ่ายเม็ดแก้วสะอาด กำลังขยาย 10,000 เท่า



รูปที่ 25 ภาพถ่ายเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป กำลังขยาย 10,000 เท่า

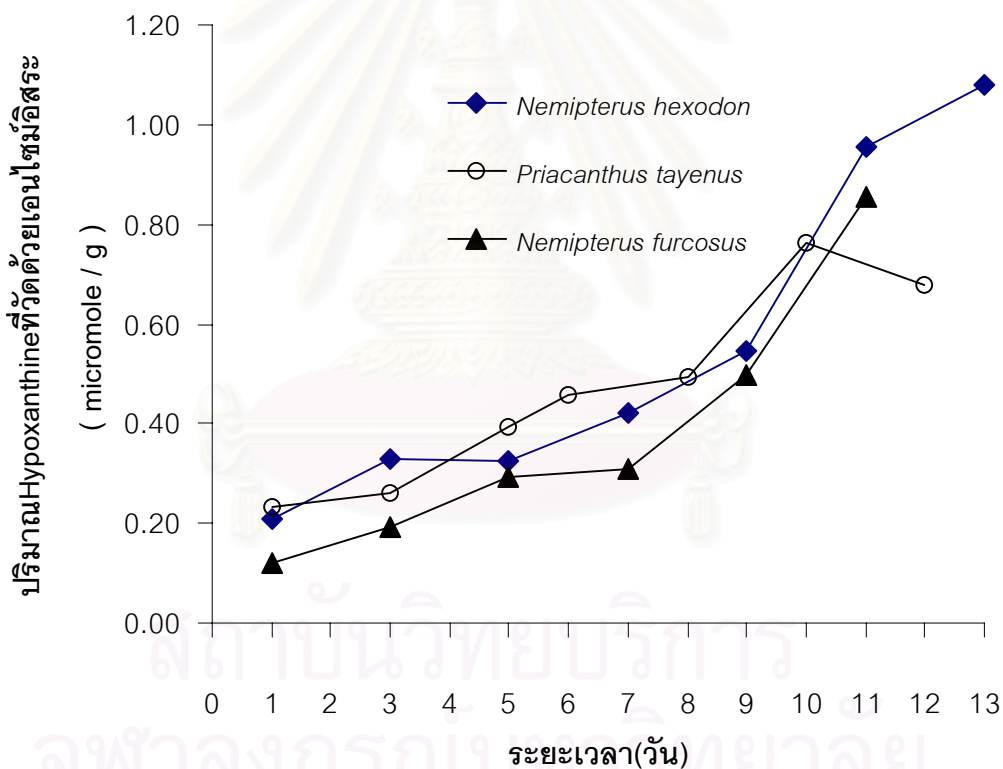


รูปที่ 26 ภาพถ่ายเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป กำลังขยาย 35,000 เท่า

4.3 การตรวจวัดปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และปลาดาทาหวาน โดยใช้เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

4.3.1 ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และปลาดาทาหวานที่เก็บไว้ในน้ำแข็ง

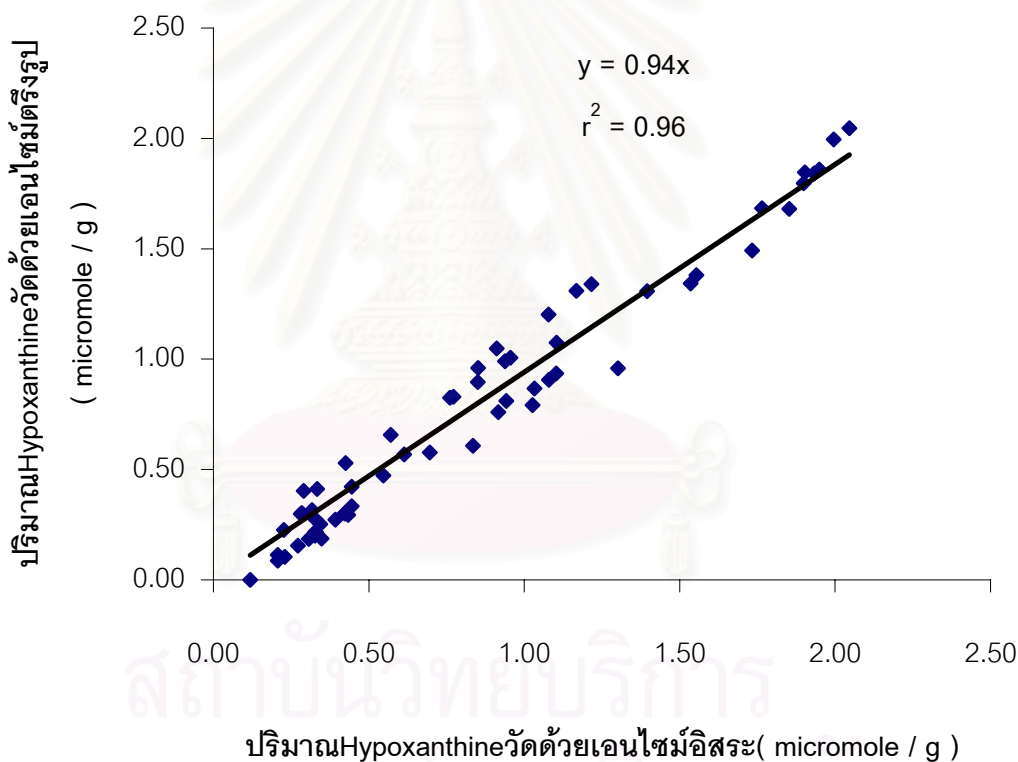
จากผลการทดลองที่แสดงรูปที่ 27 เมื่อเก็บปลาทรายแดงทั้งพันธุ์ *Nemipterus hexodon* และ *Nemipterus furcosus* ในน้ำแข็งระยะเวลาสั้น ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดงทั้ง 2 พันธุ์จะสูงขึ้น และเมื่อเก็บปลาดาทาหวานในน้ำแข็งระยะเวลาสั้น พบว่าปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาดาทาหวานจะสูงขึ้นจนถึงวันที่ 10 หลังจากนั้นปริมาณ Hypoxanthine จะมีแนวโน้มลดลง



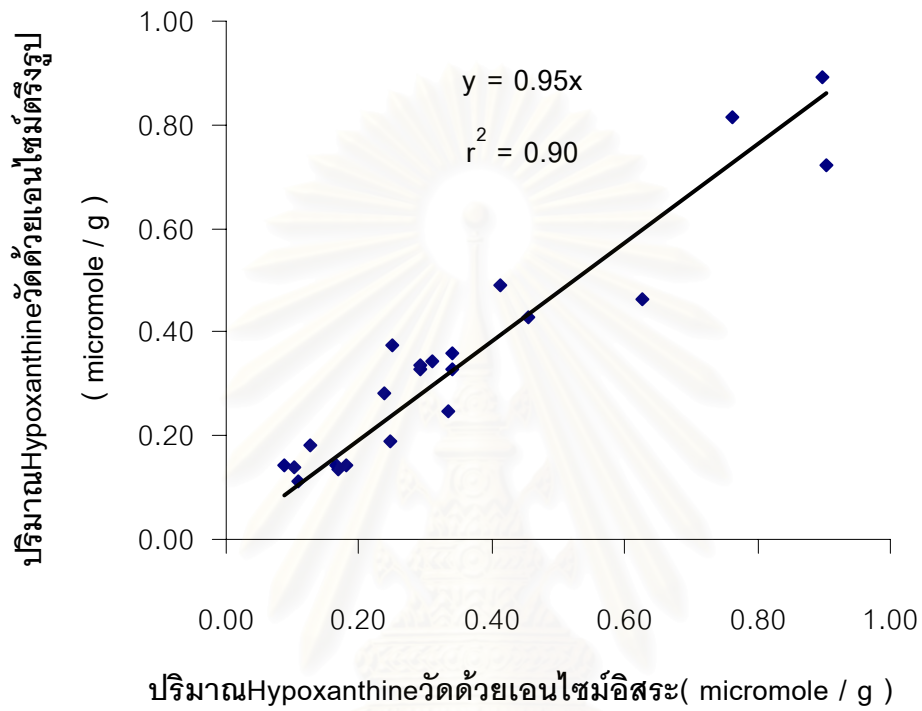
รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระในเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และเนื้อปลาดาทาหวานที่เก็บไว้ในน้ำแข็งกับระยะเวลาการเก็บ

4.3.2 เปรียบเทียบปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงกับเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระของเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์ และเนื้อปลาทูหวาน

จากผลการทดลองที่แสดงรูปที่ 28 และ 29 จะเห็นว่า การหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดงทั้งพันธุ์ *Nemipterus hexodon* และ *Nemipterus furcosus* ด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปกับการหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดงทั้ง 2 พันธุ์นี้ด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ จะมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันอย่างมาก ($r^2 = 0.96$ สำหรับ *Nemipterus hexodon* และ $r^2 = 0.90$ สำหรับ *Nemipterus furcosus*)



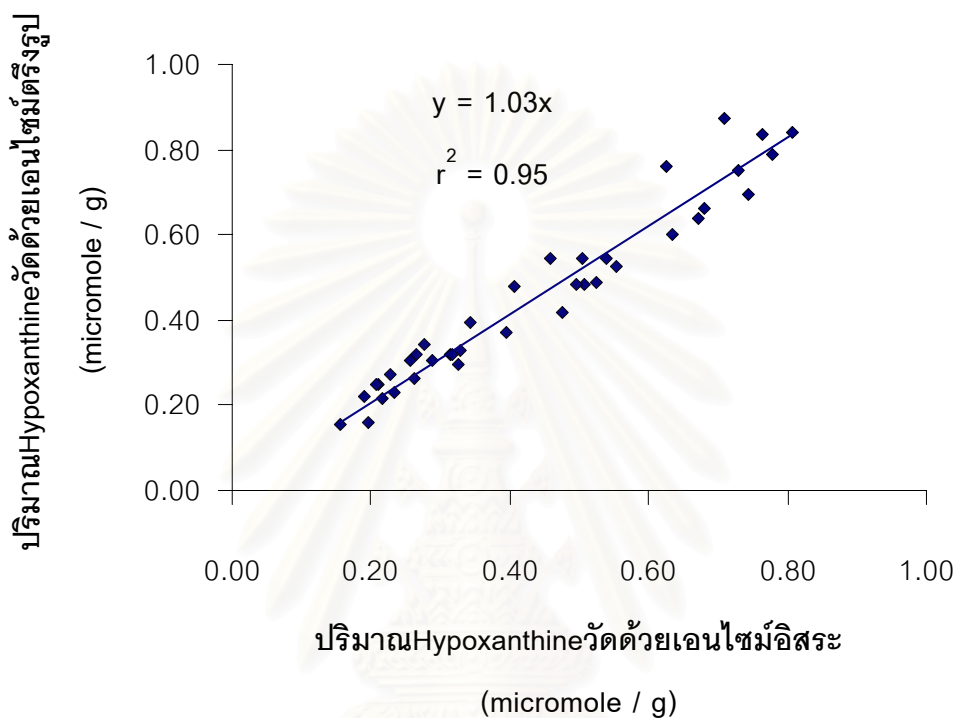
รูปที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระของเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon*



รูปที่ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase โครงสร้างและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระของเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

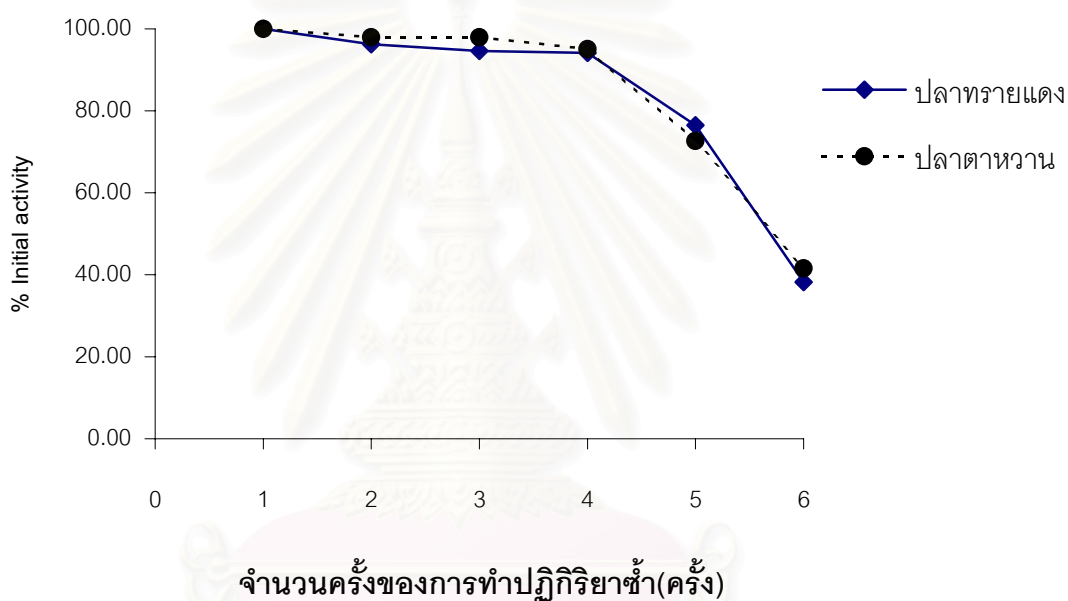
จากผลการทดลองที่แสดงรูปที่ 30 จะเห็นว่า การหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาตาหวานด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปกับการหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาตาหวานด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสาระ จะมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันอย่างมาก ($r^2 = 0.95$)



รูปที่ 30 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสาระของเนื้อปลาตาหวาน

4.3.3 ความคงตัวต่อการทำปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตีรังรูป เมื่อใช้กับสารสกัดจากปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* และ ปลาดาทาหวาน

จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 31 เมื่อนำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตีรังรูปทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากปลาพบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตีรังรูปจะลดลงอย่างมากหลังจากการทำปฏิกิริยาซ้ำที่ 4 ซึ่งทั้งสารสกัดจากปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* และปลาดาทาหวาน (*Priacanthus tayenus*) จะให้ผลไปในทางเดียวกัน



รูปที่ 31 ความสัมพันธ์ระหว่าง %Initial activity ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตีรังรูปกับ
จำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำ

4.4 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ Hypoxanthine กับลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB-N ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความเหนียวของเจล (Gel Strength) จากเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และเนื้อปลาดาทาหวาน

ผลการวัดปริมาณ Hypoxanthine ด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระ ระดับคุณภาพของลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB-N ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความเหนียวของเจลจากเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์คือ *Nemipterus hexodon* และ *Nemipterus furcosus* เป็นไปดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ ส่วนของปลาดาทาหวาน (*Priacanthus tayenus*) เป็นไปดังแสดงในตารางที่ 7

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บนานขึ้น ระดับคุณภาพของปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่ประเมินจากลักษณะทางกายภาพลดลง ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลามีค่าสูงขึ้นเช่นเดียวกับค่า TVB-N และปริมาณจุลินทรีย์ ในขณะที่ค่าความเหนียวของเจลมีค่าลดลง และยังสามารถบอกได้ว่าปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่มีความสดมาก จะมีปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.20 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาที่เริ่มเน่าเสีย จะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 1.00 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง

จากตารางที่ 6 พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกับตารางที่ 5 นั่นคือ เมื่อระยะเวลาในการเก็บนานขึ้น ระดับคุณภาพของปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่ประเมินจากลักษณะทางกายภาพลดลง ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลามีค่าสูงขึ้นเช่นเดียวกับค่า TVB-N และปริมาณจุลินทรีย์ ในขณะที่ค่าความเหนียวของเจลมีค่าลดลง และยังสามารถบอกได้ว่าปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่มีความสดมาก จะมีปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.12 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาที่เริ่มเน่าเสีย จะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 0.80 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง

จากผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บนานขึ้น ระดับคุณภาพของปลาที่ประเมินจากลักษณะทางกายภาพลดลง ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลามีค่าสูงขึ้นจนถึงวันที่ 10 หลังจากนั้นจะลดลง ในขณะที่ค่า TVB-N และปริมาณจุลินทรีย์ มีค่าสูงขึ้นเรื่อยๆ ส่วนค่าความเหนียวของเจลมีค่าคงที่ และยังสามารถบอกได้ว่าปลาดาทาหวานที่มีความสดมากจะมีปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.20 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาดาทาหวานที่เริ่มเน่าเสีย จะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 0.50 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 5 ปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดโดยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสรและเอนไซม์ Xanthine oxidase ตีรูป ลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความหนืดของเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่	Hx(เอนไซม์อิสระ) (μ mole/g)	Hx(เอนไซม์ตีรูป) (μ mole/g)	TVB (mg/100g)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (colony/g)	Gel strength (g.cm)	ระดับคุณภาพของ ลักษณะทางกายภาพ
1	0.21 \pm 0.08 ^c	0.09 \pm 0.08 ^d	16.00 \pm 2.05 ^c	(1.56 \pm 0.29) $\times 10^4$ ^c	1693.81 \pm 297.11 ^b	ดีมาก
3	0.33 \pm 0.02 ^c	0.22 \pm 0.03 ^{cd}	15.57 \pm 2.36 ^{bc}	-	1455.24 \pm 153.61 ^b	ดี
5	0.34 \pm 0.09 ^c	0.29 \pm 0.09 ^{cd}	13.57 \pm 0.77 ^{bc}	(1.81 \pm 0.25) $\times 10^4$ ^c	1881.00 \pm 614.51 ^b	ดี
7	0.38 \pm 0.07 ^c	0.36 \pm 0.10 ^c	15.19 \pm 3.63 ^{bc}	(1.69 \pm 0.70) $\times 10^4$ ^c	1667.65 \pm 356.18 ^b	ดี
9	0.65 \pm 0.20 ^b	0.65 \pm 0.25 ^b	18.13 \pm 3.64 ^{bc}	-	699.23 \pm 269.88 ^a	พอใช้
11	0.96 \pm 0.13 ^a	1.01 \pm 0.10 ^a	19.03 \pm 0.99 ^b	(5.35 \pm 0.74) $\times 10^4$ ^b	-	พอใช้
14	1.08 \pm 0.20 ^a	1.20 \pm 0.21 ^a	23.81 \pm 2.57 ^a	(1.35 \pm 0.46) $\times 10^5$ ^a	531.01 \pm 81.04 ^a	ไม่ดี

a,b,c ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p \leq 0.05)

ตารางที่ 6 ปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดโดยเอนไซม์ Xanthine oxidase และเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป ลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความหนืดของเนอปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่	Hx(เอนไซม์อิสระ) (μ mole/g)	Hx(เอนไซม์ตรึงรูป) (μ mole/g)	TVB (mg/100g)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (colony/g)	Gel strength (g.cm)	ระดับคุณภาพของ ลักษณะทางกายภาพ
1	0.12 \pm 0.04 ^e	0.14 \pm 0.02 ^d	16.37 \pm 3.01 ^c	(1.38 \pm 0.56) $\times 10^4$ ^b	1247.74 \pm 275.23 ^b	ดีมาก
3	0.19 \pm 0.05 ^{de}	0.16 \pm 0.03 ^d	17.59 \pm 1.63 ^c	(1.86 \pm 0.83) $\times 10^4$ ^b	1010.63 \pm 351.73 ^b	ดี
5	0.29 \pm 0.04 ^{cd}	0.33 \pm 0.03 ^c	18.02 \pm 0.88 ^{bc}	(2.45 \pm 0.52) $\times 10^4$ ^b	631.78 \pm 175.95 ^a	ดี
7	0.31 \pm 0.05 ^c	0.32 \pm 0.06 ^c	18.29 \pm 0.45 ^{bc}	-	708.24 \pm 89.57 ^a	ดี
9	0.50 \pm 0.11 ^b	0.46 \pm 0.03 ^b	20.84 \pm 1.36 ^{ab}	(3.34 \pm 0.61) $\times 10^4$ ^b	557.61 \pm 164.23 ^a	พอใช้
11	0.85 \pm 0.08 ^a	0.81 \pm 0.08 ^a	21.99 \pm 0.34 ^a	(1.16 \pm 0.19) $\times 10^5$ ^a	-	ไม่ดี

a,b,c ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 7 ปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดโดยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระและเอนไซม์ Xanthine oxidase โครงรูป ลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความเหนียวของเนือปลาตาหวาน (*Priacanthus tavenus*) ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่	Hx(เอนไซม์อิสระ) ($\mu\text{mole/g}$)	Hx(เอนไซม์โครงสร้าง) ($\mu\text{mole/g}$)	TVB (mg/100g)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (colony/g)	Gel strength ^{ns} (g.cm)	ระดับคุณภาพของ ลักษณะทางกายภาพ
1	0.22 ± 0.04 ^e	0.24 ± 0.05 ^c	13.21 ± 2.25 ^c	(2.92 ± 0.15) × 10 ^{4 c}	1576.53 ± 442.71	ดี
3	0.27 ± 0.07 ^e	0.29 ± 0.08 ^c	14.52 ± 0.87 ^c	(5.42 ± 0.71) × 10 ^{4 b}	1526.16 ± 349.63	ดี
5	0.40 ± 0.11 ^d	0.37 ± 0.10 ^c	16.66 ± 0.03 ^b	(6.05 ± 1.65) × 10 ^{4 b}	-	พอใช้
6	0.46 ± 0.15 ^{cd}	0.54 ± 0.19 ^b	18.81 ± 0.72 ^b	-	1566.23 ± 615.52	พอใช้
8	0.55 ± 0.11 ^{bc}	0.54 ± 0.10 ^b	18.39 ± 0.64 ^b	(5.64 ± 0.98) × 10 ^{4 b}	1722.32 ± 374.87	พอใช้
10	0.77 ± 0.05 ^a	0.83 ± 0.04 ^a	26.58 ± 1.07 ^a	-	-	ไม่ดี
12	0.68 ± 0.05 ^{ab}	0.66 ± 0.08 ^b	27.05 ± 1.80 ^a	(2.36 ± 0.20) × 10 ^{5 a}	1802.14 ± 365.92	ไม่ดี

a,b,c ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันแนวดิ่งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p ≤ 0.05)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวของเม็ดแก้ว

5.1.1 ขนาดของเม็ดแก้ว

เม็ดแก้วขนาด 50-140 mesh ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากเศษแก้วจากเครื่องแก้วในห้องทดลองเช่น บีกเกอร์แตก เป็นต้น โดยการนำส่วนใสที่ไม่มีตัวพิมพ์ของบีกเกอร์แตกมาทุบและร่อนด้วยเครื่องเขย่าแบบตะแกรงร่อนให้ได้ขนาดในช่วง 50-140 mesh ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 106-300 μm โดยขนาดของเม็ดแก้วดังกล่าวเป็นขนาดเม็ดแก้วที่ใกล้เคียงกับที่ Shintani และคณะ (1994) ใช้ในการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บน Aminopropyl – Controlled pore glass (CPG) จากการใช้เศษแก้วมาทำการทดลองจึงไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการซื้อเม็ดแก้วขนาดละเอียดเช่นนี้ซึ่งมีราคาแพง โดยเฉพาะถ้าเป็น Aminopropyl – CPG จะมีราคาแพงมาก ทำให้นำมาพัฒนาเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปบนเม็ดแก้วที่ได้จากเศษแก้วแตกนี้ สำหรับวัดความสดในอุตสาหกรรมได้ในราคาที่ไม่แพงนัก

อีกทั้งจากผลการทดลองจะเห็นว่า เม็ดแก้วขนาด 50-140 mesh (106-300 μm) มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรโดยประมาณมากกว่าเม็ดแก้วขนาด 2 มม. มาก และเมื่อนำไปใช้ตรึงเอนไซม์แล้ววัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปโดยใช้สารละลาย Hypoxanthine ใน Phosphate buffer pH 7.5 เป็น Substrate จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์สูงกว่าการใช้เม็ดแก้วขนาด 2 มม. ในการตรึงเอนไซม์ รวมทั้งยังใช้เม็ดแก้วขนาด 50-140 mesh ในปริมาณที่ต่ำกว่าเม็ดแก้วขนาด 2 มม. อีกด้วย นั้นแสดงว่าการใช้เม็ดแก้วที่มีขนาดเล็กลง ทำให้พื้นที่ผิวของตัวพุง (Carrier) ที่ใช้ตรึงเอนไซม์มีมากขึ้น จึงมีผลให้เอนไซม์ติดบนตัวพุงมากขึ้น ส่งผลให้การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปสูงขึ้น (Chibata, 1978) ดังนั้นเม็ดแก้วขนาด 50-140 mesh จึงเป็นขนาดของเม็ดแก้วที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวเม็ดแก้วที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

5.1.2 ความเข้มข้นของ Aminopropyltriethoxysilane (APTS) และ Glutaraldehyde

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 3x2 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test พบว่า ความเข้มข้นของ APTS และความเข้มข้นของ Glutaraldehyde มีผลต่อการทำปฏิกิริยาของ เอนไซม์ Xanthine oxidase โครงสร้างที่แสดงในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยความเข้มข้นของ APTS 10.0%(v/v) และความเข้มข้นของ Glutaraldehyde 5.0%(v/v) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ในการตรึงเอนไซม์ Xanthine Oxidase บนผิวของเม็ด ซึ่งความเข้มข้นของ APTS 10.0%(v/v) เป็น ความเข้มข้นเดียวกับที่ Janowski และคณะ (1991) ใช้ในการทำ Silanization กับ CPG และ ความเข้มข้นของ Glutaraldehyde 5.0%(v/v) เป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ Shintani และคณะ (1994) ใช้ในการตรึงเอนไซม์ Xanthine Oxidase บน Aminopropyl - CPG และยังมีรายงานว่า มีการใช้ความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde บนผิวของตัวพุงที่เป็นแก้วมากกว่านี้ ความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde นั้นมีผลต่อปริมาณพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นในการ ตรึงเอนไซม์ ถ้าความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde น้อย พันธะโควาเลนต์เกิดขึ้นน้อย ปริมาณเอนไซม์จึงถูกตรึงบนตัวพุงน้อย ถ้าความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde มาก พันธะโควาเลนต์เกิดขึ้นมาก ปริมาณเอนไซม์จึงถูกตรึงบนตัวพุงมาก ถ้าความเข้มข้นของ APTS และ Glutaraldehyde มากเกินไป พันธะโควาเลนต์เกิดขึ้นมากเกินไป ปริมาณเอนไซม์ถูกตรึงบน แก้วพุงตัวมากเกินไปจนเกิดความหนาแน่นของเอนไซม์ มีผลทำให้เกิดการบดบังบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์จากโมเลกุลของเอนไซม์ตัวอื่น ทำให้ Substrate ไม่สามารถเข้าไปทำ ปฏิกิริยาได้ (Heinrichova *et al.*, 1989) และพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นมากเกินไปยังมีผลให้ เอนไซม์จะถูกจำกัดการเปลี่ยนแปลงโครงรูป (Conformation) ซึ่งจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาของ เอนไซม์อีกด้วย (Toldra, Jansen and Tsao, 1986)

5.1.3 ปริมาณเม็ดแก้ว

การใช้เม็ดแก้วปริมาณ 2.00 กรัมในการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ ที่สูงกว่าการใช้เม็ดแก้วปริมาณ 1.00 กรัม และ 3.00 กรัม อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เป็นเพราะปริมาณเม็ดแก้ว 1.00 กรัม เป็นปริมาณเม็ดแก้วที่น้อย พื้นที่ผิวจึงน้อย ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงได้น้อย ส่วนปริมาณเม็ดแก้ว 3.00 กรัม เป็นปริมาณที่มากเกินไป จนเกิดการอุดตันของเม็ดแก้วในหลอดทดลองที่มีขนาดจำกัดคือมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มม. ซึ่งเป็นหลอดทดลองที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเท่าที่สามารถหาได้ เมื่อเขย่าเม็ดแก้วกับสารละลายในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ เม็ดแก้วที่ถูกทับอยู่ด้านล่างของหลอดทดลองจึงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ทั่วถึงในสารละลาย ประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ลดลง เอนไซม์จึงถูกตรึงได้น้อยลง ดังนั้นปริมาณเม็ดแก้ว 2.00 กรัมจึงเป็นปริมาณเม็ดแก้วที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวเม็ดแก้วที่จะใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

5.1.4 ความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase

เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase ในการตรึงเอนไซม์ เพิ่มขึ้นจาก 0.10 U/ml เป็น 0.20 U/ml จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.40 U/ml จนถึง 0.60 U/ml พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นั่นเป็นเพราะการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มากเกินไป ทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวพวยงมากเกินไปจนเกิดความหนาแน่นของเอนไซม์ มีผลทำให้เกิดการบดบังบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์จากโมเลกุลของเอนไซม์เอง ทำให้ Substrate ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ (Heinrichova *et al.*, 1989) ดังนั้นความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase 0.20 U/ml จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวเม็ดแก้วที่จะใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

5.1.5 วิธีการล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึง

การล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงออกเป็นการกำจัดเอนไซม์อิสระที่ไม่ได้ถูกตรึงบนเม็ดแก้วออกไปเพื่อให้เอนไซม์ตรึงรูปพร้อมสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ ในการทดลองใช้วิธีการล้าง 3 แบบ คือการใช้ Phosphate buffer pH 7.5 เย็นซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง การใช้น้ำกลั่นเย็น และการใช้น้ำกลั่นเย็นร่วมกับสารละลาย NaCl 1 M เย็นซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Shintani และคณะ (1994) พร้อมทั้งเปรียบเทียบการล้างเอนไซม์ที่ตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้กับการล้างเอนไซม์ที่ตรึงด้วย Physical adsorption และพันธะอิออนิก พบว่าการล้างด้วยน้ำกลั่นเย็นร่วมกับสารละลาย NaCl 1M เย็นจะล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงออกได้มากที่สุด โดยดูได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์มีค่าต่ำกว่าการล้างอีก 2 วิธี เนื่องจากสารละลาย NaCl 1M มีความเข้มข้นของอิออน (Ionic strength) สูง ทำให้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้วด้วย Physical adsorption และพันธะอิออนิกหลุดออกไป (Chibata, 1978) ซึ่งดูได้จากเอนไซม์ที่ตรึงด้วย Physical adsorption และพันธะอิออนิก จะเหลือแอกติวิตีที่แสดงในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์น้อยที่สุด เมื่อผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นร่วมกับสารละลาย NaCl 1 M

ส่วนการล้างด้วย Phosphate buffer pH 7.5 เย็นจะล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงออกได้มากเป็นอันดับถัดมา เนื่องจาก Phosphate buffer เป็นสารที่มีความเป็นเกลืออ่อนๆแต่ไม่สูงเท่าสารละลาย NaCl 1M จึงล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้วด้วย Physical adsorption และพันธะอิออนิกได้น้อยกว่าการล้างด้วยน้ำกลั่นร่วมกับสารละลาย NaCl 1M ในขณะที่การล้างด้วยน้ำกลั่นจะล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงออกได้น้อยกว่าทั้ง 2 วิธี เนื่องจากน้ำกลั่นมีความเข้มข้นของอิออนต่ำจึงล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้วด้วย Physical adsorption และพันธะอิออนิกได้น้อยกว่าการล้างทั้ง 2 วิธี

การล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงออกทั้ง 3 วิธีจำนวน 2 – 10 ครั้ง ไม่ได้ทำให้เอนไซม์หลุดออกไปมากขึ้นซึ่งดูได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรของกรด Uric ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ โดยทั้งการล้างเอนไซม์ที่ตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์และการล้างเอนไซม์ที่ตรึงด้วย Physical adsorption และพันธะอิออนิก ให้ผลการทดลองที่เหมือนกันแสดงว่าการล้างจำนวน 2 ครั้งน่าจะเพียงพอสำหรับล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงออกไป

ในการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์มักจะล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วย Physical adsorption และพันธะอิออนิกออกไป ดังที่มีรายงานไว้ในงานวิจัยของ Shintani และคณะ (1994) ที่ล้างเอนไซม์ออกโดยใช้น้ำกลั่นเย็น 100 ml ต่อด้วยสารละลาย NaCl 1 M 100 ml และล้างด้วยน้ำเย็นอีก 1000 ml ซึ่งใช้น้ำกลั่นเป็นจำนวนมาก แต่ใช้เวลาในการล้างนาน ในงานวิจัยนี้จึงไม่ใช้

วิธีการล้างนี้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง และงานวิจัยมุ่งเน้นที่จะได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์รูปที่มากที่สุด จึงไม่จำเป็นต้องกำจัดเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วย Physical adsorption และพันธะอิออนิกออกไปให้มากที่สุดจากการทดลอง จึงเลือกวิธีการล้างเอนไซม์ออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เป็นวิธีการล้างที่เหมาะสมที่สุด

5.2 ศึกษาสมบัติ ความคงตัว และอายุการใช้งานของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

5.2.1 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

จากผลการทดลองพบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปเท่ากับของเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระคือที่ 8.0 โดย pH มีผลต่อการแตกอิออน (Ionization) ของ Prototropic group ที่อยู่ในบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูป (Conformation) ของเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับกับ Substrate หรือการเร่งปฏิกิริยา (Whitaker, 1972) และที่ pH สูงหรือต่ำเกินไป มีผลให้เอนไซม์เสียสภาพไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้

5.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

จากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปเท่ากับ 35 °C ซึ่งแตกต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระที่เท่ากับ 40 °C เป็นเพราะปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนต์ในการตรึงเอนไซม์ค่อนข้างรุนแรง จึงมีผลโดยตรงต่อบริเวณเร่ง (Active site) และโครงรูป (Conformation) ของเอนไซม์ ทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปเปลี่ยนแปลงไป (Kilara and Shahani, 1979)

5.2.3 ความคงตัวต่อการทำปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 18 พบว่าที่อุณหภูมิ 35°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปนั้น จะให้จำนวนครั้งของการทำปฏิกิริยาล้างน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C ทั้งนี้เป็นเพราะถึงแม้ที่อุณหภูมิ 35 °C จะเพิ่มพลังงานจลน์ทำให้

เอนไซม์เปลี่ยน substrate เป็น product ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C แต่ก็มีผลทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพไปบางส่วนด้วย เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปไปวัดซ้ำหลายๆครั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรที่ได้ จึงลดลงอย่างมาก การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 °C ถึงแม้จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรในการทำปฏิกิริยาครั้งแรกต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °C แต่สามารถทำปฏิกิริยาซ้ำได้ มากกว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °C จึงเลือกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 25 °C ใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

เมื่อนำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปมาทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิที่ 25 °C แล้วนำไปหาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตรึงรูปหลังการทำปฏิกิริยาซ้ำ พบว่าการทำปฏิกิริยาซ้ำ 5 ครั้งทำให้ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตรึงรูปลดลงประมาณ 25 µg ในขณะที่แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่แสดงในรูปของค่า Initial activity จะลดลงจากค่า Initial activity ของการทำปฏิกิริยาซ้ำครั้งแรกถึง 60 % นั้นแสดงว่าการทำปฏิกิริยาซ้ำจะทำให้เอนไซม์ Xanthine oxidase หลุดออกไปเรื่อยๆซึ่งดูจากปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง และยังทำให้จะทำให้เอนไซม์ตรึงรูปเสียสภาพไปบางส่วนด้วย อาจสังเกตได้จากแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ลดลงอย่างมากหลังทำปฏิกิริยาซ้ำ ในขณะที่ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตรึงรูปลดลงเพียงเล็กน้อย การเสียสภาพไปของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปอาจเกิดจากอุณหภูมิเพราะจากข้อมูลที่ขลุกข้างขวดระบุไว้ว่าต้องเก็บเอนไซม์ Xanthine oxidase ไว้ในที่เย็น การนำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปไปใช้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลานานจึงมีผลให้เอนไซม์เสียสภาพไปเร็วขึ้น

จากการทดสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry ที่ทำในการทดลองข้างต้น ว่าสามารถวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเอนไซม์ Xanthine oxidase ที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้วได้หรือไม่ พบว่า เมื่อใส่สารละลาย HCl 0.2 N ในหลอดทดลองที่ใส่เม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปอยู่ กรด HCl จะไปตัดพันธะโควาเลนต์ที่ตรึงเอนไซม์อยู่ เอนไซม์ Xanthine oxidase ทั้งหมดที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้วอยู่ จะหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย และเมื่อนำไปวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ทั้งหมด เมื่อเพิ่มปริมาณเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปในการวิเคราะห์มากขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ที่ได้จึงสูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ที่ได้จากเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ใส่สารละลาย HCl กับที่ไม่ใส่สารละลาย HCl ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการทดลองข้างต้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นั้นแสดงว่าการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry ที่ทำในการทดลองข้างต้นที่ไม่ได้ใส่สารละลาย HCl นั้น สามารถวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเอนไซม์ Xanthine oxidase ที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้วได้ เพราะใน Lowry reagent ที่ใช้มีสารละลาย NaOH 0.5 N อยู่ 1 ส่วนใน 5 ส่วนของปริมาตร Lowry reagent ทั้งหมด (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) ซึ่งสามารถทำลายพันธะโควาเลนต์ที่ตรึงเอนไซม์

อยู่ ทำให้เอนไซม์หลุดออกมาอยู่ในสารละลายได้ทั้งหมด ทำให้สามารถหาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ Xanthine oxidase ได้

5.2.4 อายุการเก็บรักษาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

เมื่อเก็บเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปและเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาประมาณ 20 วัน ค่า Initial activity ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่วัดได้จะลดลงประมาณ 20 % ในขณะที่ค่า Initial activity ของเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระจะลดลงถึง 90 % ดังแสดงในรูปที่ 21 แสดงว่าเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปจะมีความคงตัวในการเก็บรักษา (Storage stability) มากกว่าเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Leonowicz Sarker และ Bollag (1988) ที่ศึกษาเอนไซม์ Laccase ตรึงรูป ซึ่งการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์นั้นจะเพิ่มความคงตัวต่อการเก็บรักษา (Storage stability) ของเอนไซม์หลายชนิด (Chibata, 1978)

5.2.5 ลักษณะพื้นผิวเม็ดแก้วที่มีของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปเมื่อถ่ายภาพด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM)

จากการถ่ายภาพด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) ทำให้สามารถเห็นลักษณะพื้นผิวเม็ดแก้วที่มีขนาดเล็กมากได้อย่างชัดเจน จะเห็นว่าเม็ดแก้วที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase แล้วจะมีพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นจุดๆ สีขาวของโปรตีนของเอนไซม์กระจายอยู่ทั่วไป

5.3 การตรวจวัดปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และปลาตาหวาน โดยใช้เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

5.3.1 หาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และปลาตาหวานที่เก็บไว้ในน้ำแข็งที่เก็บไว้ในน้ำแข็ง

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเก็บปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* และ *Nemipterus furcosus* ในน้ำแข็งระยะเวลาเพิ่มขึ้น ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดงจะสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Shen Yang และ Peng (1996) ที่ศึกษาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลา Black carp ส่วนปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาตาหวานจะสูง

ขึ้นจนถึงวันที่ 10 แล้วจะมีแนวโน้มลดลง ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Beuchat (1967) ที่ศึกษาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลา Catfish Jahns และคณะ (1976) ที่ศึกษาในปลา Winter flounder Jahns และ Rand (1977) ที่ศึกษาในปลา Whiting

จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดงและปลาตาหวาน มีความแตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับที่ Botta (1995) รายงานว่าปริมาณ Hypoxanthine จะแตกต่างกันตามชนิดของปลา

5.3.2 เปรียบเทียบปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปกับเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระของเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์ และเนื้อปลาตาหวาน

จากผลการทดลองพบว่า การหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดงทั้งพันธุ์ *Nemipterus hexodon* และ *Nemipterus furcosus* ด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปกับการหาปริมาณ Hypoxanthine ด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันอย่างมาก ($r^2 = 0.96$ สำหรับ *Nemipterus hexodon* และ $r^2 = 0.90$ สำหรับ *Nemipterus furcosus*) เช่นเดียวกับการหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาตาหวานด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปกับการหาปริมาณ Hypoxanthine ด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระที่มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันอย่างมาก ($r^2 = 0.95$) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปที่ได้จากการทดลองสามารถนำไปใช้วัดความสดของปลาในรูปของปริมาณ Hypoxanthine ได้ไม่แตกต่างจากการใช้ เอนไซม์ Xanthine oxidase อิสระ

5.3.3 ความคงตัวต่อการทำปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปเมื่อใช้กับสารสกัดจากปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* และปลาตาหวาน

เมื่อนำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรงรูปมาทำปฏิกิริยาซ้ำกับสารสกัดจากทั้งปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* และปลาตาหวานให้ผลไปในทางเดียวกันคือจะทำปฏิกิริยาซ้ำได้ 4 ครั้งโดยค่า Initial activity ลดลงเล็กน้อยเท่านั้น แต่เมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำครั้งที่ 5 และ 6 ค่าแอกติวิตีดีสัมพันธ์ลดลงอย่างมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากในการเตรียมสารสกัดจากปลาใช้กรด Trichloroacetic (TCA) 10 % ซึ่งเป็นกรดที่ค่อนข้างเข้มข้นในการสกัดและใช้สารละลาย NaOH 2 N ในการทำให้สารสกัดเป็นกลางจึงเกิดเกลือที่มีความเข้มข้นสูงเกิดขึ้น ถึงแม้จะผ่านการทำให้เจือจางด้วย Phosphate buffer แล้วแต่ความเข้มข้นของเกลือก็ยังคงสูงอยู่ จึงมีผลทำให้เอนไซม์ที่

ถูกตรึงแบบ Physical adsorption และพันธะอ็อกซิดิกหลุดออกไปได้มาก (Chibata, 1978) ประกอบกับเอนไซม์เสียสภาพไปจากการทำปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิ 25 °C เช่นเดียวกับผลในข้อ 5.2.3 จึงทำให้เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปทำปฏิกิริยาซ้ำได้เพียง 4 ครั้ง

5.4 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ Hypoxanthine กับลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB-N ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความเหนียวของเจล (Gel Strength) จากเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์และเนื้อปลาดาทาหวาน

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บปลาทรายแดงทั้ง 2 พันธุ์นานขึ้น ระดับคุณภาพของปลาที่ประเมินจากลักษณะทางกายภาพลดลง ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลามีค่าสูงขึ้นเช่นเดียวกับค่า TVB-N และปริมาณจุลินทรีย์ ในขณะที่ค่าความเหนียวของเจลมีค่าลดลง โดยค่า TVB-N ที่วัดได้มีความคลาดเคลื่อนในการวัดสูง เนื่องจากปลาทรายแดงในช่วงวันแรกที่เก็บมีความสดมาก ปริมาณ TVB-N ในเนื้อปลาจึงมีน้อยมากเช่นกัน ทำให้ปริมาณกรด Hydrochloric ที่ใช้ในการไตเตรทหาค่า TVB-N น้อยมาก จึงเกิดความคลาดเคลื่อนในการไตเตรทจากการคำนวณค่า TVB-N พบว่าถ้าใช้ปริมาณกรด Hydrochloric เพิ่มขึ้นเพียง 0.02 ml ค่า TVB-N จะเปลี่ยนไปถึง 2 mg/100g

เมื่อสังเกตปริมาณ Hypoxanthine ค่า TVB-N ปริมาณจุลินทรีย์ ค่าความแข็งแรงของเจล และระดับคุณภาพของปลาที่ประเมินจากลักษณะทางกายภาพ สามารถบอกได้ว่าปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่มีความสดมากจะมีปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.20 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาที่เริ่มเน่าเสีย จะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 1.00 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่มีความสดมากจะมีปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.12 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาที่เริ่มเน่าเสีย จะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 0.80 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง

ส่วนปริมาณ Hypoxanthine ของปลาดาทาหวานเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอื่นๆพบว่า เมื่อระยะเวลาในการเก็บปลาดาทาหวานนานขึ้น ระดับคุณภาพของปลาที่ประเมินจากลักษณะทางกายภาพลดลง ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลามีค่าสูงขึ้นจนถึงวันที่ 10 หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่ค่า TVB-N และปริมาณจุลินทรีย์ มีค่าสูงขึ้นเรื่อยๆ ส่วนค่าความเหนียวของเจลไม่เปลี่ยนแปลงซึ่งอาจเป็นเพราะปลาดาทาหวานมีเกล็ดละเอียดติดแน่นกับหนังและหนังของปลาดาทาหวานแข็งและหนา จึงทำให้เนื้อปลาภายในเน่าเสียจากจุลินทรีย์และสภาวะแวดล้อมภายนอกได้น้อยกว่าปลาทรายแดงที่มีเกล็ดใหญ่และหลุดง่าย จากปริมาณ Hypoxanthine ที่ได้สามารถบอกได้ว่าปลาดาทาหวานที่มีความสดมากจะมีปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.20 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง

และส่วนปลาตาทหวนที่เริ่มเน่าเสียจะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 0.50 ไมโครโมลต่อกรัม ตัวอย่าง

จะเห็นว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่วัดได้ของปลาทรายแดงทั้ง 2 พันธุ์และปลาตาทหวนมีค่าค่อนข้างต่ำคือประมาณ 1×10^5 โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง ถึงแม้จะเก็บปลาทรายแดงไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา มากกว่า 10 วันก็ตาม ซึ่งยังเป็นค่าที่ต่ำกว่าปริมาณจุลินทรีย์ของซูริมิแช่เยือกแข็งที่สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2533) กำหนดไว้คือ 1×10^7 โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง นั่นอาจเป็นเพราะปลาทรายแดงและปลาตาทหวนเก็บไว้ในน้ำแข็งที่มีน้ำผสมอยู่ จุลินทรีย์ที่เจริญขึ้นจึงถูกเจือจางลง ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่วัดได้ค่อนข้างต่ำ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

การทำเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปสำหรับวัดความสดของปลาด้วยการหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลา มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase บนผิวเม็ดแก้วคือ ใช้เม็ดแก้วขนาด 50-140 mesh ซึ่งได้จากเศษแก้วจากเครื่องแก้วในห้องทดลอง เช่น บีกเกอร์แตกที่เป็นของเหลือทิ้ง ใช้ปริมาณเม็ดแก้ว 2.00 กรัม ใช้สารละลาย Aminopropyltriethoxysilane เข้มข้น 10 % เพื่อเป็นสารกระตุ้นผิวเม็ดแก้วให้มีหมู่อะมิโน ใช้สารละลาย Glutaraldehyde เข้มข้น 5 % เพื่อเป็นสารเชื่อมระหว่างเม็ดแก้วกับเอนไซม์ ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase 0.20 U/ml ปริมาณ 1 ml และล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงด้วยน้ำกลั่นเย็น 2 ครั้ง

สมบัติของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ได้คือมี pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 8.0 และ 35°C ตามลำดับ สามารถทำปฏิกิริยาซ้ำได้ไม่ต่ำกว่า 4 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 25 °C มีอายุการใช้งานไม่ต่ำกว่า 20 วัน เมื่อเก็บที่ 4 °C

เมื่อหาปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดง 2 พันธุ์ คือ *Nemipterus hexodon* และ *Nemipterus furcosus* รวมทั้งเนื้อปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ที่เก็บไว้ในน้ำแข็ง พบว่าปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาทรายแดงทั้ง 2 พันธุ์สูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ ในขณะที่ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลาตาหวานจะสูงขึ้นจนถึงวันที่ 10 หลังจากนั้นปริมาณ Hypoxanthine จะมีแนวโน้มลดลง เมื่อเปรียบเทียบการวัดปริมาณ Hypoxanthine ด้วยเอนไซม์อิสระกับการวัดปริมาณ Hypoxanthine ด้วยเอนไซม์ตรึงรูป พบว่ามีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างมาก ($r^2=0.96$ สำหรับเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* $r^2=0.90$ สำหรับเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* และ $r^2=0.95$ สำหรับเนื้อปลาตาหวาน)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ Hypoxanthine กับลักษณะทางกายภาพ ค่า TVB ปริมาณจุลินทรีย์ และค่าความเหนียวของเจลจากเนื้อปลาทรายแดงทั้ง 2 พันธุ์และเนื้อปลาตาหวาน พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บปลาทรายแดงทั้ง 2 พันธุ์นานขึ้น ระดับคุณภาพของปลาที่ประเมินจากลักษณะทางกายภาพลดลง ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลามีค่าสูงขึ้นเช่นเดียวกับกับค่า TVB และปริมาณจุลินทรีย์ ในขณะที่ค่าความเหนียวของเจลมีค่าลดลง และสามารถบอกได้ว่าปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่มีความสดมากจะมีปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.20 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาที่เริ่มเน่าเสียจะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 1.00 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่มีความสดมากจะมี

ปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.12 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาที่เริ่มเน่าเสียจะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 0.80 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง

เมื่อระยะเวลาในการเก็บปลาดาทาวนานขึ้น ระดับคุณภาพของปลาที่ประเมินจากลักษณะทางกายภาพลดลง ปริมาณ Hypoxanthine ในเนื้อปลามีค่าสูงขึ้นและจะลดลงหลังวันที่ 10 ส่วนค่า TVB และปริมาณจุลินทรีย์จะมีค่าสูงขึ้น ในขณะที่ค่าความเหนียวของเจลไม่เปลี่ยนแปลง และสามารถบอกได้ว่า ปลาดาทาวที่มีความสดมากจะมีปริมาณ Hypoxanthine น้อยกว่า 0.20 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนปลาดาทาวที่เริ่มเน่าเสียจะมีปริมาณ Hypoxanthine มากกว่า 0.50 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการตรึงเอนไซม์ Xanthine oxidase ด้วยวิธีการอื่นๆ และการใช้ตัวพุง (Carrier) ชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปที่ดีขึ้น
2. ควรศึกษาปริมาณ Hypoxanthine ในปลาชนิดอื่นๆที่ใช้ในอุตสาหกรรมซูริมิ
3. ควรศึกษาปริมาณ Hypoxanthine ในปลาขนาดต่างๆเพราะปริมาณ Hypoxanthine อาจจะมี ความแตกต่างได้ตามขนาดของปลา



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กลุ่มสถิติและสารสนเทศการประมง. 2542. สถิติผลผลิตสัตว์ทะเล ปี 2539. กรุงเทพฯ : กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง.

นงลักษณ์ สุทธิวนิช. 2531. คุณภาพสัตว์น้ำ. สงขลา : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปราณี อานเบื่อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปรียานฎ สุชะวิสิษฐ์ และเพ็ญแข ชื่นจิตต์ผ่อง. 2525. ปลาสำคัญทางเศรษฐกิจ รายงานทางวิชาการที่ สจ/24/6. กรุงเทพฯ : กรมประมง.

วราทิพย์ สมบุญญฤทธิ. 2531. คุณภาพเนื้อปลาสดแบบสุริมิจากปลาหลังเขียวและปลานิลสด และแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. 2541. วิธีการตรวจสอบคุณภาพซูริมิของสถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. ใน อรรถวรรณ คงพันธุ์, พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล และจิราภรณ์ รุ่งทอง (บรรณาธิการ), การตรวจสอบคุณภาพซูริมิ, หน้า 32-42. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2533. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เนื้อปลาสด (ซูริมิ) เยือกแข็ง. มอก. 935-2533. กรุงเทพฯ : สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กระทรวงอุตสาหกรรม.

สุเชษฐ์ สมุหเสนีโต. 2535. การใช้ปลาแช่แข็งเป็นวัตถุดิบในการผลิตซูริมิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หน่วยสำรวจแหล่งประมง. 2516. การศึกษาชีวิตประวัติของปลาทรายแดงและปูม้าในอ่าวไทยโดยเรือสำรวจประมง 1. กรุงเทพฯ : กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ภาษาอังกฤษ

A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. USA : Association of Official Analytical Chemists.

Banks, H., Nickelson, R. and Finne, G. 1980. Shelf life studies on carbon dioxide package finfish from the gulf of Mexico. J. Food Sci. 45 : 157-162.

- Beuchat, L.R. 1973. Hypoxanthine measurement in assessing freshness of chilled channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Agric. Food Chem. 21 : 453-455.
- Botta, J.R. 1995. Evaluation of Seafood Freshness Quality. USA : VCH Publishers.
- Branch, A.C. and Vail, A.M.A. 1985. Bringing fish inspection into the computer age. Food Technology in Australia. 37 : 352-355.
- Canada department of fisheries and oceans. 1992. Fish Inspection Regulations Amended February 25, 1992. Ottawa, Canada : Government of Canada.
- Chibata, I. 1978. Immobilized Enzyme : Reseach and Development. Tokyo : Kodansha Ltd.
- Ehira, S. and Uchiyama, H. 1969. Rapid estimation of freshness of fish by nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 35 : 1080-1085.
- Hasegawa, H. 1987. Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish Products. Singapore : Marine Fisheries Research Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Heinrichova, K., Dzurova, M., Zirolecki, A., and Wojciechowicz, M. 1989. D-Galacturonidgalacturonohydrolase covalently bound on to a polyacrylamide-type support. Letters in Applied Microbiology. 8 : 105 -107.
- Holmes, K.L., Noguchi S.F. and Macdonal G.A. 1992. The alaska pollock resource and other species used for surimi. In Lanier, T.C. and Lee, C.M. (eds.), Surimi Technology, pp. 41. New York : Marcel Dekker.
- Jahns, F.D., Howe, J.L., Coduri, R.J., Jr. and Rand, A.G., Jr. 1976. A rapid visual enzyme test to assess fish freshness. Food Technol. 30 (July) : 27-30.
- Jahns, F.D. and Rand, A.G., Jr. 1977. Enzyme method to assess marine good quality. In Ory, R.L. and Angelo, A.J. (eds.), Enzyme in Food and Beverage Processing, pp.47. Connecticut : AVI Publishing.
- Janowski, F., Fischer, G., Urbaniak, W., Foltynowicz, Z., and Marciniak, B. 1991. Aminopropylsilane treatment for the surface of porous glass suitable for enzyme immobilisation. J. Chem. Tech. Biotechnol. 51 : 263-272.
- Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. 1987. Enzyme immobilization. In Rehm, H.J. and Reed, G. (eds.), Biotechnology vol. 7a, pp.347-404. USA:VCH Publishers..

- Kilara, A., and Shahani, K.M. 1979. The use of immobilized enzyme in the food industry : A review. CRC Critical Review in Food Science and Nutrition. 12(2) : 161-198.
- Leonowicz, A., Sarker, J.M., and Bollag, J.M. 1988. Improvement in stability of an Immobilized fungal laccase. Applied Microbiology and Biotechnology. 29 : 129-135.
- Martin R. 1988. Contaminants in relation to quality of seafood. Food Technol. 42 (12) :104,108.
- Mulchandani, A., Male, K.B., and Luong, J.H.T. 1990. Development of a biosensor for assaying postmortem nucleotide degradation in fish tissues. Biotechnology and Bioengineering. 35 : 739–745.
- Shen, L., Yang, L. and Peng, T. 1996. Amperometric determination of fish freshness by hypoxanthine biosensor. J. Sci. Food Agric. 70 : 298-302.
- Shintani, H., Wojcik, A.B., Tawa, R. and Uchiyama, S.1994. Uremic toxin analysis with pre- and post-column immobilized enzyme reactors. In Lam, S. and Malikin, G. (eds.), Analytical Applications of Immobilized Enzyme Reactors, pp.131-173. London : Blackie Academic & Professional.
- Swaigood, H.E., Huang, X.L., and Walsh, M.K. 1997. Immobilization of enzyme by selective adsorption on biotinylaminopropyl celite or glass. In Bickerstaff, G.F. (ed.), Immobilization of Enzyme and Cells, pp. 13-20. New Jersey : Humana Press.
- Trevar, M.D. 1980. Immobilized Enzyme. New York : John Wiley and Sons.
- Toldra, F., Jansen, N.B., and Tsao, G.T. 1986. Use of porous glass fiber as a support forbiocatalyst immobilization. Biotechnology Letters. 8 (11) : 785-790.
- Toyoda, K., Kimura, I., Fujita, T., Noguchi, F.S. and Lee, C.M. 1992. The surimi manufacturing process. In Lanier, T.C. and Lee, C.M. (eds.), Surimi Technology, pp. 41. New York : Marcel Dekker.
- Uno, T. and Nakamura, M. 1958. Studies on the characteristic quality of fish meat on kamaboko (steamed fish cake) forming ability. Bull. Hokkaido Reg. Fish. Res. Lab. 18 : 45 – 53.
- Watanabe, E., Ando, K., Karube, I., Matsuoka, H. and Suzuki, S. 1983. Determination of hypoxanthine in fish meat with an enzyme sensor . J. Food Sci. 48 : 496-500.

Waterman JJ. 1982. Composition and Quality of Fish. Edinburgh : Her Majesty's Stationery Office.

Weetall, H.H. 1976. Covalent coupling methods for Inorganic support materials. Methods in Enzymology. 44 : 134-148.

Whitaker, J.R. 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. New York : Marcel Dekker.

Zikakis, J.P. 1980. Xanthine oxidase. US Patent 4,238,566.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

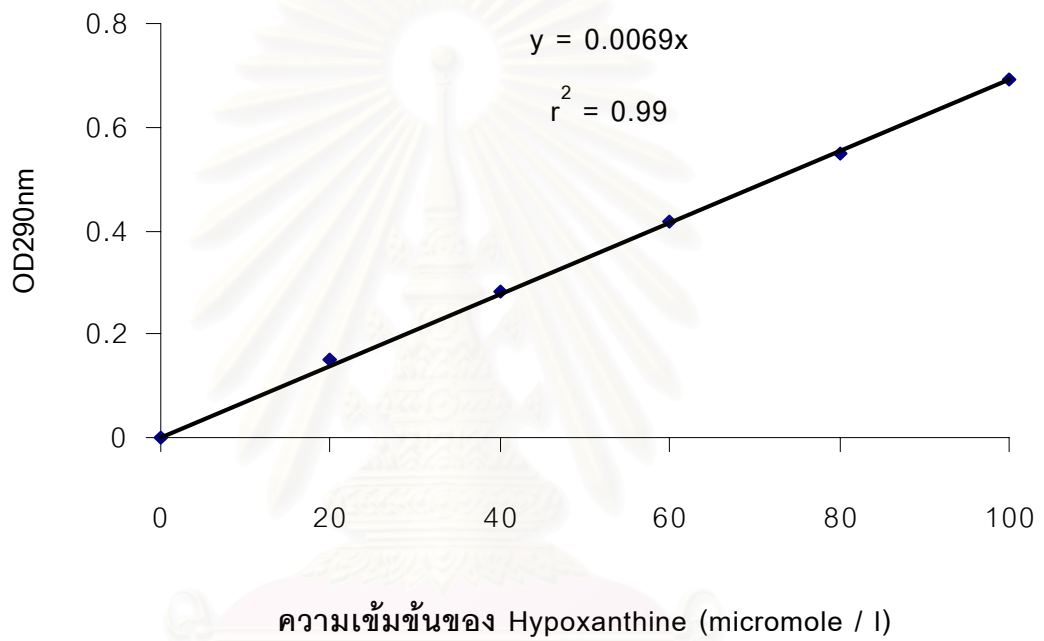


ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

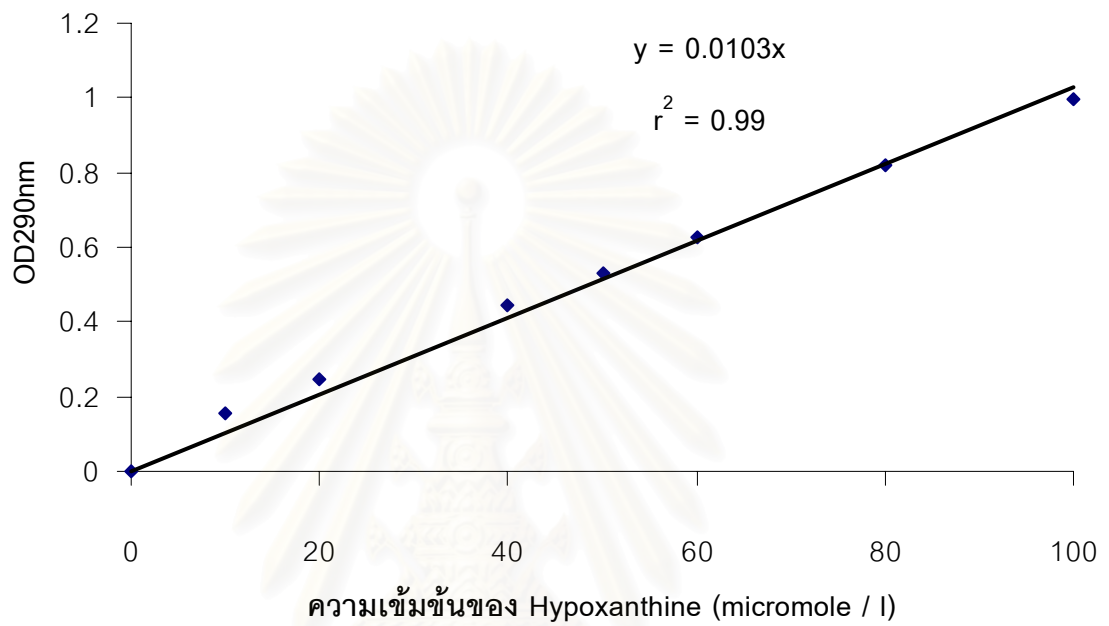
ภาคผนวก ก.

กราฟมาตรฐานที่ใช้หาปริมาณ Hypoxanthine



รูปที่ 32 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Hypoxanthine ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Hypoxanthine ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ Xanthine oxidase อีสระ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

วิธีวิเคราะห์

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Hall, 1996)

อุปกรณ์ - เครื่อง Spectrophotometer

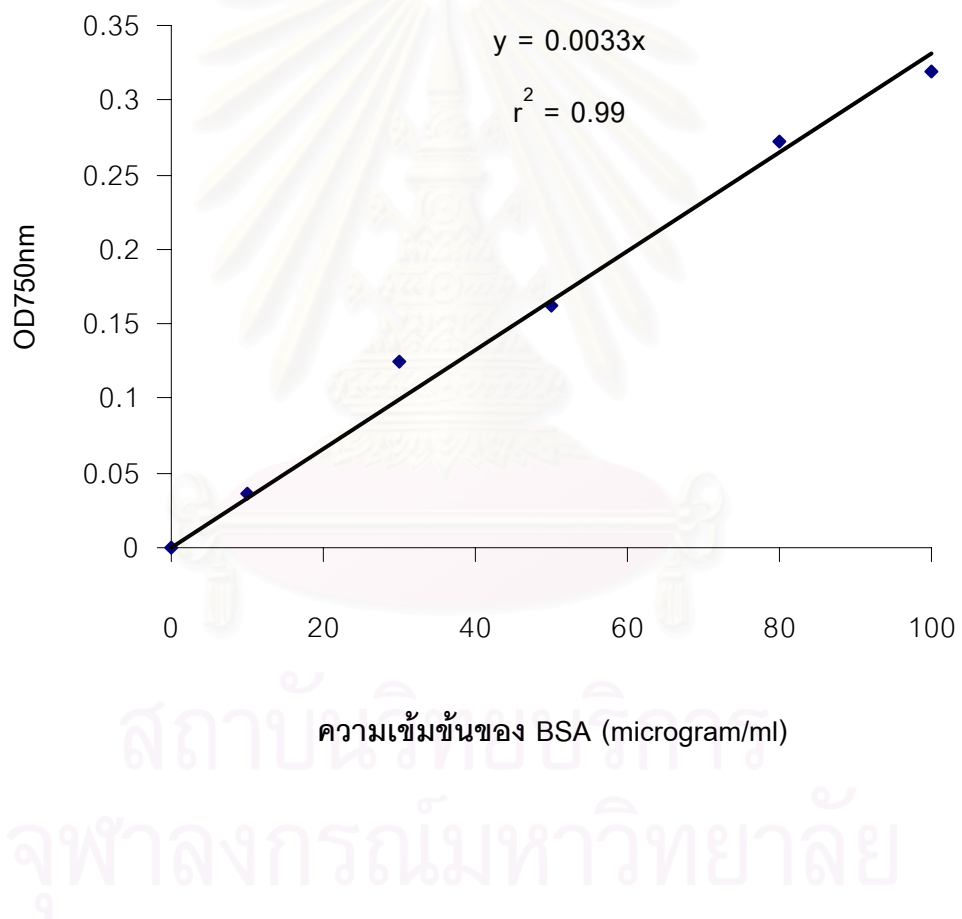
- เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่อยู่ในหลอดทดลอง
- หลอดทดลองที่มีเม็ดแก้วที่ผ่านการทำ Silanization แล้ว 2.00 กรัม

สารเคมี - Reagent A (Copper reagent) : ผสม 7.7% Na_2CO_3 2% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ 1% Sodium potassium tartrate

- Reagent B : 1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Reagent C : 0.5 N NaOH
- Lowry reagent : ผสม Reagent A 3 ส่วน + Reagent B 1 ส่วน + Reagent C 1 ส่วน (ใช้ภายใน 3 สัปดาห์)
- 0.2 N Folin reagent
- สารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ใช้ทำกราฟมาตรฐาน

วิธีการทดลอง

1. ใส่ 1.0 ml ของสารละลาย BSA เข้มข้นในช่วง 10 – 100 $\mu\text{g/ml}$ ลงในหลอดทดลองที่มีเม็ดแก้วที่ผ่านการทำ Silanization แล้ว 2.00 กรัม
2. ใส่ 1.0 ml ของ Lowry reagent ผสมแล้วทิ้งไว้ 10 นาที
3. ใส่ 0.5 ml Folin reagent ผสมอย่างรวดเร็ว ทิ้งไว้ 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm.
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm. ที่ได้จากข้อ 4 มาลบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm. ของ Blank ที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลาย BSA
6. ทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ
7. ใส่น้ำกลั่น 1.0 ml และ Lowry reagent 1.0 ml ในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปอยู่
8. ทำตามขั้นตอนในข้อ 2 – 4
9. เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm. ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA เพื่อหาปริมาณโปรตีน



รูปที่ 34 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ข.2 การวิเคราะห์ระดับคุณภาพของลักษณะทางกายภาพ (Branch and Vail, 1985)

วิธีการทดลอง

สังเกตลักษณะทางกายภาพต่างๆของปลา แล้วให้คะแนนดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 8 เกณฑ์ในการให้คะแนนจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพต่างๆของปลา

ลักษณะทางกายภาพที่สังเกต		คะแนน			
		0	1	2	3
ลักษณะปรากฏ		สดใสมาก	สดใส	สดใสน้อย	ไม่สดใส
ผิว		แน่น	นิ่ม		
เกล็ด		ติดแน่น	หลวมเล็กน้อย	หลวม	
เมือก		ไม่ปรากฏ	เมือกเล็กน้อย	เมือก	เมือกมาก
ระยะการเกร็งตัว		Pre-rigor	Rigor	Post-rigor	
ตา	ความใส	ใส	ขุ่นเล็กน้อย	ขุ่น	
	รูปทรง	ปกติ	โป่งเล็กน้อย	โป่ง	
	ม่านตา	เห็น	ไม่เห็น		
	เลือด	ไม่มีเลือด	มีเลือดเล็กน้อย	มีเลือดมาก	
เหงือก	สี	ไม่เปลี่ยนแปลง	ดำหรือจางเล็กน้อย	ดำหรือจางมาก	
	เมือก	ไม่ปรากฏ	ไม่มาก	มาก	
	กลิ่น	สด	กลิ่นปลา	ไม่สด	กลิ่นเน่า
พุง	การเปลี่ยนสี	ไม่ปรากฏ	เล็กน้อย	ปานกลาง	มาก
	ความแน่น	แน่น	นิ่ม	แตก	
รูทวาร	สภาพ	ปกติ	แตกเล็กน้อย	แตกมาก	
	กลิ่น	สด	ไม่มีกลิ่น	กลิ่นปลา	กลิ่นเน่า
ช่องท้อง	สี	สีออกเหลือง	สีเทา	สีน้ำตาลเหลือง	
	เลือด	แดง	แดงดำ	น้ำตาล	

ที่มา : Branch และ Vail (1985)

รวมคะแนนที่ได้โดย คะแนน น้อยกว่า 5 คะแนน ปลาที่มีคุณภาพดีมาก
 คะแนน 6-18 คะแนน ปลาที่มีคุณภาพดี
 คะแนน 18-24 คะแนน ปลาที่มีคุณภาพพอใช้
 คะแนน มากกว่า 24 คะแนน ปลาที่มีคุณภาพไม่ดี

ข.3 การวิเคราะห์ค่า TVB-N (Hasegawa, 1987)

อุปกรณ์ - จาน Conway

- Micro-burette
- เครื่องบด

สารเคมี - 4% Trichloroacetic acid (TCA)

- สารละลาย Mixed indicator : ละลาย Bromocresol green 0.01 กรัม และ Methyl red 0.02 กรัม ใน Ethanol 10 ml
- สารละลาย Inner ring (สารละลาย Boric 1% + สารละลาย Mixed indicator) : ชั่ง Boric acid 1 กรัม ใน Volumetric flask 100 ml เติม Ethanol 20 ml หลังจาก Boric acid ละลาย เติมสารละลาย Mixed indicator 1 ml แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น
- สารละลายอิมิตัว Potassium carbonate (K_2CO_3) : ละลาย K_2CO_3 60 กรัมในน้ำกลั่น 50 ml ต้มให้เดือดเล็กน้อย 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง
- 0.02 N Hydrochloric acid (HCl)
- Grease

วิธีการทดลอง

1. แล่เนื้อปลา แล้วชูดเนื้อปลามา ระวังไม่ให้มี Red muscle เส้นใยเกี่ยวพัน และผิวหนังติดออกมา บดให้เข้ากัน ชั่งตัวอย่างเนื้อปลาบด 10 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน นำตัวอย่างเนื้อปลาบดปั่นผสมกับ TCA 4% 40 ml โดยใช้เครื่องปั่น ประมาณ 30 วินาที แล้วทิ้งไว้ 30 นาที
2. Centrifuge 3,000 rpm 10 นาที
3. ทา Grease ที่ขอบฝาจาน Conway
4. ใส่สารละลาย Inner ring ภายใน Inner ring ของจาน Conway
5. ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 ml ภายใน Outer ring ของจาน Conway (กรณี Blank test ให้ใช้ 4% TCA 1 ml แทนสารละลายตัวอย่าง)
6. ใส่สารละลายอิมิตัว Potassium carbonate 1 ml ภายใน Outer ring ของจาน Conway
7. รีบปิดฝาจาน Conway ทันทัน หนีบด้วยคลิป แล้วผสมสารละลายที่อยู่ใน Outer ring จาน Conway โดยหมุนเบาๆ
8. เก็บที่ 37 °C 2 ชั่วโมง
9. ไตเตรทสารละลาย Inner ring ด้วย 0.02 N HCl ที่เทียบมาตรฐานแล้ว จนสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู

10. คำนวณค่า TVB-N

$$\text{ค่า TVB-N (mg/100 g)} = \frac{(V_S - V_B) \times N_{\text{HCl}} \times 14 \times [(W_S \times M/100) + V_{\text{TCA}}] \times 100}{W_S}$$

เมื่อ V_S คือ ปริมาณ (ml) ของ HCl ที่ใช้ไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง

V_B คือ ปริมาณ (ml) ของ HCl ที่ใช้ไตเตรทกับ Blank

N_{HCl} คือ Normality ของ HCl ที่ใช้ไตเตรท

W_S คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

M คือ % ความชื้นของตัวอย่าง

V_{TCA} คือ ปริมาณของ TCA ที่ใช้ในการสกัด

ข.4 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995)

อุปกรณ์ - ตู้อบลมร้อน

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 5 กรัม
2. นำตัวอย่างไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 6 ชั่วโมง
3. นำออกจากตู้อบและทิ้งไว้ให้เย็น ในโถดูดความชื้น (Desiccator) และชั่งน้ำหนัก
4. นำไปอบต่ออีกประมาณ 1 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่
5. คำนวณปริมาณความชื้นหรือน้ำที่หายไป

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนการอบ (กรัม)}}$$

ข.5 การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (ICMSF, 1974)

อุปกรณ์ - เครื่องปั่น

- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 °C

สารเคมี - 0.1% Peptone water

- Plate count agar (PCA)

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ในโถเครื่องปั่นที่ Sterile แล้ว
2. เติม 0.1% Peptone water 450 ml
3. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยปั่นในเครื่องปั่น 2 นาที จะได้สารละลายที่เป็น Dilution 10^{-1}
4. เจือจางโดยปิเปตสารละลาย 1.0 ml ใส่ใน 9 ml ของ 0.1% Peptone water ที่อยู่ในหลอดทดลอง จะได้สารละลายที่เป็น Dilution 10^{-2} และเจือจางต่อจนได้ Dilution 10^{-3}
5. ปิเปตสารละลาย Dilution 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} 1.0 ml ใส่ใน Sterile plate
6. Pour plate ด้วย Plate count agar (PCA)
7. บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 °C 48 ชั่วโมง
8. นับจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นระหว่าง 30-300 โคโลนี
9. คำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Colony / g.)

ข.6 การเตรียมซุริมิ (สุเชษฐ์ สมุหเสณีโต, 2535)

อุปกรณ์ - เครื่องบดเนื้อปลา

สารเคมี - เกลือ

วิธีการทดลอง

1. นำปลาสดมาแล่เอาเนื้อออก แล้วชูดเนื้อออกจากหนังและส่วนที่ติดกับก้างโดยใช้ช้อน เก็บรวบรวมเนื้อจนได้ปริมาณที่ต้องการ
2. นำเนื้อปลาที่ได้มาบดโดยใช้เครื่องบดเนื้อปลา
3. ล้างเนื้อปลาในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10 °C โดยใช้น้ำ 4 ส่วน ต่อเนื้อปลา 1 ส่วน กวนเนื้อปลาให้กระจายในน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที กำจัดไขมันที่ลอยอยู่บนผิวน้ำทิ้งไป พร้อมกับน้ำส่วนที่เกิน

4. กำจัดน้ำออก โดยนำเนื้อปลาใส่ผ้าขาวบาง แล้วบีบน้ำออกให้มากที่สุด
5. การล้างเนื้อปลาในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10 °C อีก 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายจะเติมเกลือ 0.15 % โดยน้ำหนัก
6. เมื่อล้างครบแล้วนำมากำจัดน้ำส่วนเกินออกให้มากที่สุด

ข.7 การเตรียมเจล (ดัดแปลงจากวิธีของสถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ (2541) และวิธีของสุเชษฐ์ สมุหเสนีโต (2535))

อุปกรณ์ - เครื่องบดเนื้อปลา
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

สารเคมี - เกลือ

วิธีการทดลอง

1. นำซูริมิมาผสมกับเกลือ 3 % โดยน้ำหนัก ใส่เกลือโดยแบ่งเกลือครึ่งหนึ่งใส่หลังจากผสมซูริมิไปแล้ว 5 นาที ผสมจนครบ 5 นาที จึงเติมเกลือที่เหลือ ผสมต่ออีก 10 นาที ระวังไม่ให้อุณหภูมิต่ำลงในการผสมเกิน 10 °C อุปกรณ์ในการสับควรแช่ให้เย็นก่อนนำมาใช้ (สุเชษฐ์ สมุหเสนีโต, 2535)
2. นำซูริมิที่ผสมแล้วบรรจุใส่ในท่อสแตนเลสเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ความยาว 6 เซนติเมตร บรรจุใส่ถุงพลาสติก ไล่อากาศออก แล้วรัดหนังยางให้แน่น
3. นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 °C 20 นาที แล้วต้มต่อที่อุณหภูมิ 90 °C 20 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำเย็นเพื่อปรับอุณหภูมิให้เท่าอุณหภูมิห้อง (สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, 2541)
4. นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C 1 คืน ก่อนนำไปวัดความเหนียว (Gel Strength) ต้องนำตัวอย่างซูริมิเจลออกจากตู้เย็นเพื่อปรับอุณหภูมิให้เท่ากับอุณหภูมิห้องก่อน (สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, 2541)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข.8 การวิเคราะห์ค่าความเหนียว (Gel Strength)

อุปกรณ์ - Texture analyzer (TA-XT2i)

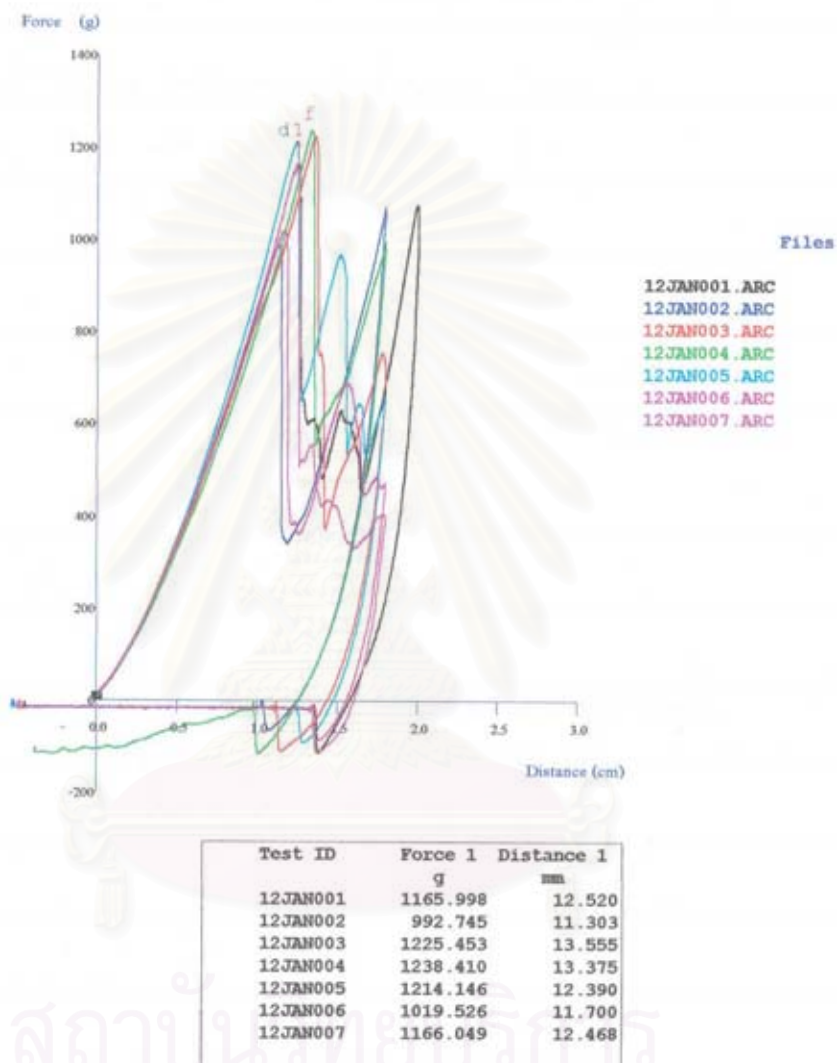
วิธีการทดลอง

1. เปิดเครื่อง Texture analyzer (TA-XT2i)
 2. Calibrate force และประกอบ Probe P0.25S Spherical stainless จากนั้น
Calibrate probe ให้ได้ระยะ 30 mm
 3. Set ค่าต่างของการวัดดังนี้

Mode :	Measure Force in Compression
Option :	Return to start
Pre-test speed :	1.0 mm/s
Test speed :	1.1 mm/s
Post-test speed :	10 mm/s
Distance :	20 mm
Trigger force :	Auto – 10 g
Data acquisition rate	200 pps
 4. ตัดตัวอย่างซูริมิเจลเป็นท่อนยาว 25 mm นำตัวอย่างวางบน Platform ของเครื่อง
Texture analyzer (TA-XT2i)
 5. Run เครื่อง Texture analyzer (TA-XT2i) จะได้กราฟระหว่างค่า Force (g) และ ค่า
Distance (cm)
 6. หาค่า Force (g) และ ค่า Distance (cm) ของ Peak แรกที่ได้จากกราฟ นำไป
คำนวณค่าความเหนียว (Gel Strength)
- ค่าความเหนียว (Gel Strength, g.cm) = Force (g) X Distance (cm)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Stable Micro Systems - Texture Expert



รูปที่ 35 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงต้านการเจาะ (Force) กับระยะทางของการเจาะ (Distance) ที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Texture analyzer (TA-XT2i)

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของกรด Uric ที่ได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป เมื่อใช้ APTS 2% 5% 10% และ Glutaraldehyde (GLT) 3% 5% ในการตรึงเอนไซม์

SOV	df	MS	F
APTS	2	0.0003292	2.263
GLT	1	0.0001620	1.114
APTS * GLT	2	0.0005932	4.078 *
Error	12	0.0001454	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของกรด Uric ที่ได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป เมื่อใช้ปริมาณเม็ดแก้ว 2.00 3.00 และ 4.00 กรัมในการตรึงเอนไซม์

SOV	df	MS	F
Treatment	2	0.02218	14.161*
Error	9	0.01566	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm ของกรด Uric ที่ได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูป เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Xanthine oxidase 0.10 0.20 0.40 และ 0.60 U/ml ในการตรึงเอนไซม์

SOV	df	MS	F
Treatment	3	0.007438	33.577*
Error	12	0.0002215	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างแบบจับคู่โดยวิธี t test (Paired – samples t test) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry ของเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปที่ใส่สารละลาย HCl กับไม่ใส่สารละลาย HCl

เปรียบเทียบ	Mean	Std. deviation	Std. error mean	t	df
ใส่ HCl กับ ไม่ใส่ HCl	-0.00824	0.01898	0.004141	-1.989 ^{ns}	20

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสรະในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	6	0.382	21.178*
Error	22	0.01802	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วย เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	6	0.580	25.385*
Error	22	0.02284	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่า TVB ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	Df	MS	F
Treatment	6	41.039	5.348*
Error	22	7.676	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ในเนื้อปลา ทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	Df	MS	F
Treatment	4	1.4×10^{10}	23.132*
Error	18	6.1×10^8	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าความเหนียว (Gel strength) ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	5	1.7×10^6	13.530*
Error	28	1.2×10^5	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	5	0.235	62.659*
Error	16	0.00375	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วยเอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	5	0.200	100.696*
Error	16	0.00199	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่า TVB ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	5	15.900	5.201*
Error	16	3.057	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	4	5.4×10^9	50.693*
Error	10	1.1×10^8	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าความเหนียว (Gel strength) ในเนื้อปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus* ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	4	5.8×10^5	11.100*
Error	26	5.2×10^4	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วย เอนไซม์ Xanthine oxidase อีสุระในเนื้อปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	6	0.167	23.645*
Error	21	0.007076	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ Hypoxanthine ที่วัดด้วย เอนไซม์ Xanthine oxidase ตรึงรูปในเนื้อปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	6	0.176	19.851*
Error	21	0.008859	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่า TVB ในเนื้อปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	6	111.838	58.873*
Error	21	1.900	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ในเนื้อปลา ตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	4	2.3×10^{10}	172.734*
Error	14	1.3×10^8	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

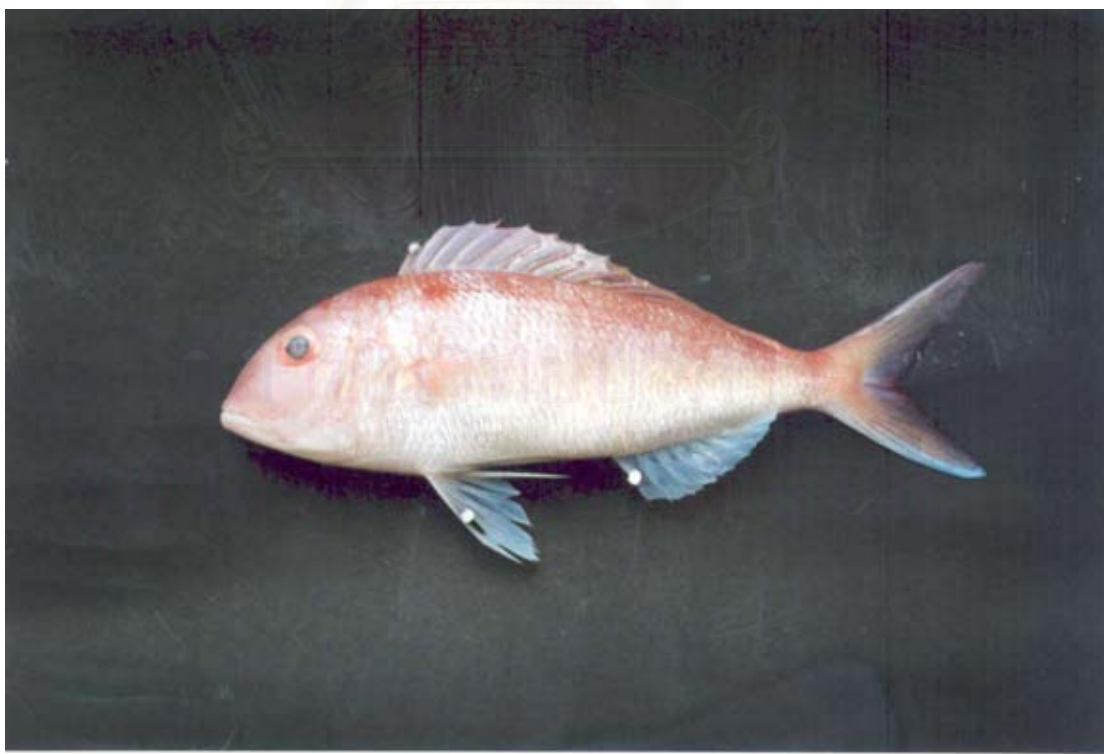
ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าความเหนียว (Gel strength) ในเนื้อ ปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ที่เก็บในน้ำแข็ง

SOV	df	MS	F
Treatment	4	113235.8	0.601 ^{ns}
Error	40	188497.5	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.

รูปต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง

รูปที่ 36 ปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus hexodon*รูปที่ 37 ปลาทรายแดงพันธุ์ *Nemipterus furcosus*



รูปที่ 38 ปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*)



รูปที่ 39 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Jasco, V530)



รูปที่ 40 เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer, TA-XT2i)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายบริพันธ์ คงเผ่า เกิดวันที่ 27 มิถุนายน พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร จากคณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม ในปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2540



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย