# โครงการ
# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** ผลของ 4-Hexylresorcinol ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมลาโนซิสในกุ้งขาว

**ชื่อนิสิต** นางสาว ศรุตา พงศ์ทองมหาคุณ
นางสาว ศุภกานต์ สังข์แก้ว

**ภาควิชา** เทคโนโลยีทางอาหาร
**ปีการศึกษา** 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ผลของ 4-Hexylresorcinol ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมลาโนซิสในกุ้งขาว


โดย

นางสาว ศรุตา พงศ์ทองมหาคุณ

นางสาว ศุภกานต์ สังข์แก้ว

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก

ดร.ปิติ อ่ำพายัพ



รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2562

# EFFECT OF 4-HEXYLRESORCINOL ON GENE EXPRESSION RELATED TO MELANOSIS IN WHITE SHRIMP

Saruta Pongtongmahakun

Supakarn Sungkaew

Project Advisor

Assoc. Prof. Chanprapa Imjongjirak, Ph.D.

Piti Amparyup, Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

**หัวข้องานวิจัย** ผลของ 4-Hexylresorcinol ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมลาโนซิสในกุ้งขาว

**โดย** นางสาว ศรุตา พงศ์ทองมหาคุณ

นางสาว ศุภกานต์ สังข์แก้ว

**สาขาวิชา** เทคโนโลยีทางอาหาร

**อาจารย์ที่ปรึกษา** รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก

**อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** ดร. ปิติ อ่ำพายัพ

**ปีการศึกษา** 2562

---

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ประจำปีการศึกษา 2562

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

**หัวข้องานวิจัย** ผลของ 4-Hexylresorcinol ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมลาโนซิสในกุ้งขาว
**โดย** นางสาว ศรุตา พงศ์ทองมหาคุณ
นางสาว ศุภกานต์ สังข์แก้ว
**สาขาวิชา** เทคโนโลยีทางอาหาร
**อาจารย์ที่ปรึกษา** รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก
**อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** ดร. ปิติ อ่ำพายัพ
**ปีการศึกษา** 2562

---

## บทคัดย่อ

กุ้งขาวเป็นสินค้าสัตว์น้ำที่มีความสำคัญต่อธุรกิจการส่งออกของไทย เป็นที่นิยมสำหรับผู้บริโภค การเกิดเมลาโนซิส (melanosis) หรือการเกิดจุดดำ ถึงแม้ว่าจะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคแต่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมอาหารทะเล ปัจจุบันมีการใช้สารยับยั้งเมลาโนซิส เช่น โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (SMS) แต่สารกลุ่มนี้เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคบางกลุ่ม และมีการใช้สาร 4-Hexylresorcinol (4-HR) มาทดแทน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความเกี่ยวข้องของระบบโพรฟีนอลออกซิเดสต่อการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาว โดยการศึกษาผลของสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR ต่อการแสดงออกของยีนโพรฟีนอลออกซิเดส *Lv*ProPO1 และ *Lv*ProPO2 และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งขาว ผลจากการตรวจการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ในกุ้งที่แช่ด้วยสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR (ความเข้มข้น 25 ppm) และ SMS (0.5%) ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO1 และ *Lv*ProPO2 มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อทำการตรวจค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งขาว กับชุดที่ทดสอบด้วยสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR และ SMS ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM พบว่าทุกชุดทดสอบมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR และ SMS ไม่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO1 และ *Lv*ProPO2 แต่ควบคุมกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาว งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าระบบโพรฟีนอลออกซิเดสมีความสำคัญต่อการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาว ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาสารยับยั้งเมลาโนซิสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทะเล

**Project Title** Effect of 4-Hexylresorcinol on gene expression related to melanosis in white shrimp
**Student** Saruta Pongtongmahakun
Supakarn Sungkaew
**Study Program** Bachelor of Science in Food Technology
**Advisor** Assoc. Prof. Chanprapa Imjongjirak, Ph.D.
**Co-advisor** Piti Amparyup, Ph.D.
**Acedemic Year** 2019

---

## ABSTRACT

Pacific white shrimp is one of Thailand's predominant exports due to its popularity. Despite its popularity, however, a harmless condition known as melanosis (dark spotting) tends to cause the value to decline. In recent years, multiple melanosis inhibitors have been developed. The first, sodium metabisulfite (SMS) has been known to cause allergic reaction and health issues in some individuals. It has been replaced by 4-Hexylresorcinol (4-HR), a less harmful alternative. This research explores the connection between prophenoloxidase and the development of melanosis in pacific white shrimp by studying the effect of 4-HR on the prophenoloxidase gene (*Lv*ProPO1 and *Lv*ProPO2) and phenoloxidase enzyme activities. By measuring the gene expression through semi-quantitative RT-PCR techniques, the shrimp treated with either 25 ppm 4-HR or 0.5% SMS showed no significant deviation in *Lv*ProPO1 and *Lv*ProPO1 presence when compared to the control specimens ($P \geq 0.05$). Regardless, the experiment did showcase a significant decrease ($p<0.05$) in phenol oxidase enzyme activity across all experimental subjects treated with 4-HR and SMS at 1, 0.1, and 0.01 mM concentrations when compared to the control group. These findings suggest that while melanosis inhibition substances do not affect *Lv*ProPO1 and *Lv*ProPO2 gene activity, they do directly impact phenol oxidase enzyme activity levels in pacific white shrimp. This underscores the significant impact of the phenol oxidase systems on shrimp melanosis, indicating the possibility of future studies on melanosis inhibition in the seafood industry.

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือของรองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก และ ดร.ปิติ อ่ำพายัพ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ศูนย์ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย อีกทั้งให้ความรู้ คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและต่อตัวผู้วิจัยเอง และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณนักวิจัย และเจ้าหน้าที่ศูนย์ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

และขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเสริมสร้างประสบการณ์ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

คณะผู้วิจัย

# สารบัญ

หน้า

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญของการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1

1.3 ขอบเขตหรือกรอบแนวคิดของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 3

2.1 กุ้งขาวแวนนาไม 3

2.2 เมลาโนซิสในกุ้งขาวแวนนาไม 3

2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาวแวนนาไม 6

2.4 การควบคุมการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาวแวนนาไมโดยใช้สารประกอบซัลไฟต์ 6

2.5 ทางเลือกทดแทนการใช้สารประกอบซัลไฟต์เพื่อควบคุมการเกิดเมลาโนซิสในกุ้ง 7

2.5.1 Reducing agent 7

2.5.2 สารให้กรด 7

2.5.3 สาร Aromatic carboxylic acid 7

2.5.4 Complexing agent 8

2.5.5 4-Hexylresorcinol 8

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง 9

3.1 ตัวอย่าง 9

3.2 สารเคมี 9

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 10

3.4 การดำเนินการทดลอง 11

3.4.1 การเตรียมกุ้งขาว 11

3.4.2 การยับยั้งการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาว 11

3.4.3 การเก็บตัวอย่างเลือด 11

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.4 การสกัด RNA 11

3.4.5 การสร้าง cDNA 12

3.4.6 การทำ PCR 12

3.4.7 การวัดค่าการแสดงออกของยีน 14

3.4.8 การวัดค่ากิจกรรมของยีน 14

3.4.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ 15

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 16

4.1 ผลการทำ PCR 16

4.2 ผลการวัดการแสดงออกของยีน 17

4.3 ผลการแสดงค่ากิจกรรมของยีน 18

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 19

เอกสารอ้างอิง 20

ภาคผนวก 23

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ความเข้มข้นของ RNA | 24 |
| 2 | การแสดงออกของยีน EF1$\alpha$ | 24 |
| 3 | การแสดงออกของยีน *Lv*ProPO1 | 25 |
| 4 | การแสดงออกของยีน *Lv*ProPO2 | 25 |
| 5 | ค่าการคำนวณการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO1 | 25 |
| 6 | ค่าการคำนวณการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO2 | 26 |
| 7 | กิจกรรมของยีนที่เวลา 30 นาที | 27 |
| 8 | การวิเคราะห์ทางสถิติของการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO1 | 28 |
| 9 | การวิเคราะห์ทางสถิติของการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO2 | 28 |
| 10 | การวิเคราะห์ทางสถิติของค่ากิจกรรมของยีน | 29 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ลักษณะของกุ้งขาวแวนนาไม | 3 |
| 2 | ลักษณะของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อเกิดการเมลาโนซิส | 4 |
| 3 | กระบวนการเกิดสารเมลานินในกุ้ง | 5 |
| 4 | กระบวนการเกิดสารเมลานินในกุ้งโดยเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส | 6 |
| 6 | ผลการทำ PCR ของยีน | 16 |
| 7 | การแสดงออกของยีน | 17 |
| 8 | ค่ากิจกรรมของยีน | 18 |
| 9 | กราฟโปรตีนมาตรฐาน | 26 |

# คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | |
|---|---|
| PPO | Polyphenoloxidase |
| SMS | Sodium metabisulfite |
| 4-HR | 4-Hexylresorcinol |
| ProPO | Prophenoloxidase gene |
| mg | มิลลิกรัม |
| kg | กิโลกรัม |
| ppm | หนึ่งส่วนในล้านส่วน |
| ADI | Acceptable Daily Intake คือ ขนาดของวัตถุเจือปนอาหารที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายเมื่อได้รับตลอดชีวิต มีหน่วยเป็นขนาดต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน |
| mM | มิลลิโมลาร์ |
| ppt | หนึ่งส่วนในหนึ่งพันส่วน |
| g | กรัม |
| µl | ไมโครลิตร |
| rpm | รอบต่อนาที |
| ng | นาโนกรัม |
| EF1$\alpha$/F | Forward Elongation factor 1-alpha Primer |
| EF1$\alpha$/R | Reverse Elongation factor 1-alpha Primer |
| *Lv*ProPO1/F | Forward *Lv*ProPO1 Primer |
| *Lv*ProPO1/R | Reverse *Lv*ProPO1 Primer |
| *Lv*ProPO2/F | Forward *Lv*ProPO2 Primer |
| *Lv*ProPO2/R | Reverse *Lv*ProPO2 Primer |
| EtBr | Ethidium bromide |
| µg | ไมโครกรัม |
| nm | นาโนเมตร |
| bp | Base pair |

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญของการวิจัย

กุ้งเป็นสินค้าสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นิยมนำมาบริโภค และยังเป็นแหล่งที่มาของโปรตีนที่สำคัญที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (นิรชา วงษ์จินดา, 2556) ทั้งนี้กุ้งยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของไทยที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศเป็นจำนวนมาก ในปี พ.ศ.2559 การส่งออกอาหารทะเลแปรรูปของไทยมีมูลค่าสูงถึง 191,005.6 ล้านบาท หรือคิดเป็นร้อยละ 20.2 ของการส่งออกอาหารทั้งหมดของไทย โดยมีสินค้าประเภทกุ้ง (กุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง กุ้งแปรรูป กุ้งกระป๋อง และกุ้งอื่นๆ) เป็นสินค้าหลัก มีสัดส่วนมากกว่าร้อยละ 35 (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2560) และมีแนวโน้มที่จะส่งออกเพิ่มมากขึ้นในทุกๆ ปี โดยในไตรมาสแรกของปี พ.ศ.2562 ไทยมีการส่งออกสินค้าอาหารทะเลแปรรูปเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.89 (วีระเดช คชเสนีย์, 2562)

โดยทั่วไปแล้วกุ้งมีอายุการเก็บรักษาอย่างจำกัด แม้จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำก็สามารถเกิดการเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ และการเกิดเมลาโนซิส (melanosis) ได้ โดยการเกิดเมลาโนซิสหรือการเกิดจุดดำจะพบในส่วนหัวและรยางค์ของกุ้ง เนื่องจากเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase) ในกุ้งจะไปออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอลกลายเป็นสารประกอบควิโนน และเกิดการโพลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ได้เป็นสารประกอบสีน้ำตาล ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน (Benjakul et al., 2005) ถึงแม้ว่าการเกิดเมลาโนซิสจะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แต่จุดดำที่เกิดขึ้นส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีการควบคุมและชะลอการเกิดเมลาโนซิสหรือจุดดำในกุ้งระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษา โดยสารที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือสารกลุ่มซัลไฟต์ เช่น โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite, SMS) แต่สารในกลุ่มนี้อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค เนื่องจากเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดอาการหอบในผู้ป่วยโรคหอบหืดได้

จากสาเหตุดังกล่าวทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารอินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค คือ 4-Hexylresorcinol (4-HR) ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียร มีประสิทธิภาพที่ความเข้มข้นต่ำ สามารถชะลอการเกิดเมลาโนซิส ช่วยยืดระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งได้ (Lopez-Caballero et al., 2006)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องของระบบโพรฟีนอลออกซิเดสต่อการเกิดเมลาโนซิสในกุ้ง โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ

1.2.1 ศึกษาผลของสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR ต่อการแสดงออกของยีนโพรฟีนอลออกซิเดส *Lv*ProPO1 และ *Lv*ProPO2 ด้วยเทคนิค RT-PCR

1.2.2 ศึกษาผลของสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งขาว ด้วยการวัด PO activity

**1.3 ขอบเขตหรือกรอบแนวคิดของการวิจัย**

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้กุ้งขาวสายพันธุ์แวนนาไม *(Litopenaeus vannamei)* เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย โดยกุ้งขาวที่นำมาศึกษาจะต้องเลี้ยงในน้ำเกลือความเข้มข้น 20 ppt และยังมีชีวิต

**1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1.4.1 ได้ข้อมูลของ 4-HR ต่อการยับยั้งการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งได้ข้อมูลของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมลาโนซิสในกุ้งขาว

1.4.2 สามารถค้นหาสารยับยั้งเมลาซิสได้จำเพาะมากยิ่งขึ้น

# บทที่ 2

# วารสารปริทัศน์

## 2.1 กุ้งขาวแวนนาไม (Vannamei shrimp)

กุ้งขาวแวนนาไม หรือ Pacific white shrimp ถูกค้นพบโดย Boome ปี ค.ศ.1931 มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Litopenaeus vannamei* เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ พบได้ทั่วไปในมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไม คือ เปลือกมีสีขาวอมชมพูถึงแดง มี 8 ปล้อง แบ่งเป็น ส่วนหัว 1 ปล้อง ส่วนตัว 6 ปล้อง และส่วนหาง 1 ปล้อง กรีด้านบนมี 8 ฟัน ขนาดตัวโตเต็มที่จะยาวประมาณ 9 นิ้ว และมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 120 กรัม (กมลศิริ พันธนียะ, 2555)

**รูปที่ 1** ลักษณะของกุ้งขาวแวนนาไม

ที่มา : https://seahistory.org/sea-history-for-kids/white-shrimp

กุ้งขาวแวนนาไมเริ่มนำมาเลี้ยงในประเทศไทยในปี พ.ศ.2541 ซึ่งในช่วงแรกยังไม่เป็นที่นิยม ประกอบกับการจัดหาพันธุ์กุ้งในขณะนั้นมีความยากลำบากและมีราคาแพง แต่ในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งข้าวเป็นที่นิยมมากในกลุ่มผู้เลี้ยงกุ้ง เนื่องจากกุ้งกุลาดำประสบปัญหาโรคระบาด ขาดแคลนพ่อพันธุ์แม่พันธุ์คุณภาพดีและปัญหาที่สำคัญคือ กุ้งกุลาดำแคระแกร็นเลี้ยงไม่โต แต่ราคาลูกกุ้งกลับสูงขึ้น ทำให้ต้นทุนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำสูงขึ้น ผู้เลี้ยงกุ้งจึงหันไปเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแทน

## 2.2 เมลาโนซิสในกุ้งขาวแวนนาไม (Melanosis in Vannamei shrimp)

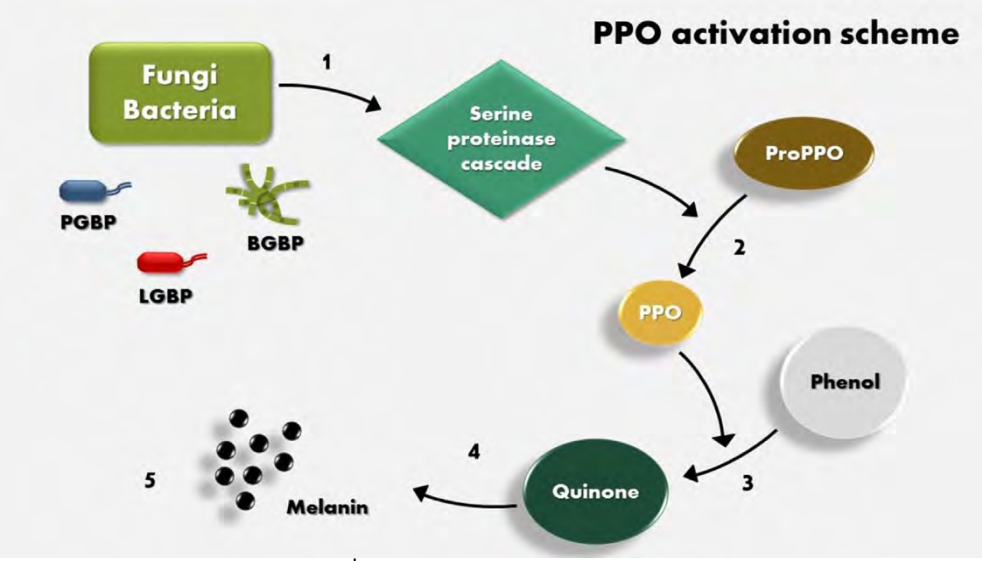
การเกิดเมลาโนซิสทางโคเด็กซ์ (Codex) ได้ให้คำจำกัดความไว้ว่าเป็นการเกิดจุดสีดำบริเวณข้อต่อของสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง (crustacean) เช่น กุ้ง ล็อบสเตอร์ และปู โดยเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเนื่องจากเอนไซม์ (oxidative enzymatic reactions) ตามด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (auto-oxidation) และการเกิดพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) (Rotllant et al., 2002) นอกจากนี้เอนไซม์ชนิดเดียวกันยังพบในผักตระกูลกะหล่ำและผลไม้ตระกูลแอปเปิ้ล โดยจะเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยช้ำหรือรอยหั่นที่สัมผัสกับ

อากาศ เอนไซม์ที่ทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสำดำหรือสีน้ำตาล คือ ฟีนอเลส (phenolase) หรืออาจเรียกว่า พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase), ไทรอกซิเนส (tyrosinase), โอฟีนอลออกซิเดส (*o*-phenol oxidase), โมโนฟีนอลออกซิเดส (monophenol oxidase) หรือ แคทีคอลออกซิเดส (catechol oxidase) เป็นต้น แต่ในกุ้งนิยมเรียกเอนไซม์ชนิดนี้ว่า พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase : PPO) ซึ่งการเกิดเมลาโนซิสจะเกิดหลังจากกุ้งตาย 2-3 ชั่วโมง (Gokoglu and Yerlikaya, 2008) และจะเห็นจุดสีดำได้ชัดเจนหลังจากเก็บกุ้งในน้ำแข็ง 2-4 วัน (Thepnuan et al., 2008) แต่การเกิดจุดดำนี้ไม่ได้ส่งผลต่อการเสื่อมเสียของกุ้ง เพียงแต่ส่งผลต่อลักษณะปรากฏของกุ้งที่ทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับ ด้วยเหตุผลนี้จึงมีการควบคุมการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งโดยการใช้สารประเภทซัลไฟต์ (sulfiting agents) เช่น SMS ซึ่งสารดังกล่าวอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค เนื่องจากเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดอาการหอบในผู้ป่วยโรคหอบหืดได้ ดังนั้นนักวิจัยจำนวนมากจึงพยายามหาวิธีการอื่นหรือสารชนิดอื่นเพื่อทดแทนการใช้สารกลุ่มดังกล่าว

**รูปที่ 2** ลักษณะของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อเกิดการเมลาโนซิส

(Alex Augusto Gonçalves and Adriene Rosceli Menezes de Oliveira, 2016)

จากรูปที่ 3 เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase, PPO) ที่พบในสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง (crustacean) จะอยู่ในรูปของไซโมเจน (zymogens) หรือที่เรียกว่า ProPPO โดยเอนไซม์ซีรีนโปรติเอส (serine proteinase) จะถูกกระตุ้นโดยสารประกอบของจุลินทรีย์ (microbial compounds) เช่น คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate), ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) และโปรตีนอื่นๆ และไปเหนี่ยวนำให้ ProPPO เปลี่ยนเป็น PPO ที่อยู่ในรูปพร้อมใช้งาน (Yu-Chi Wang et al., 2006)

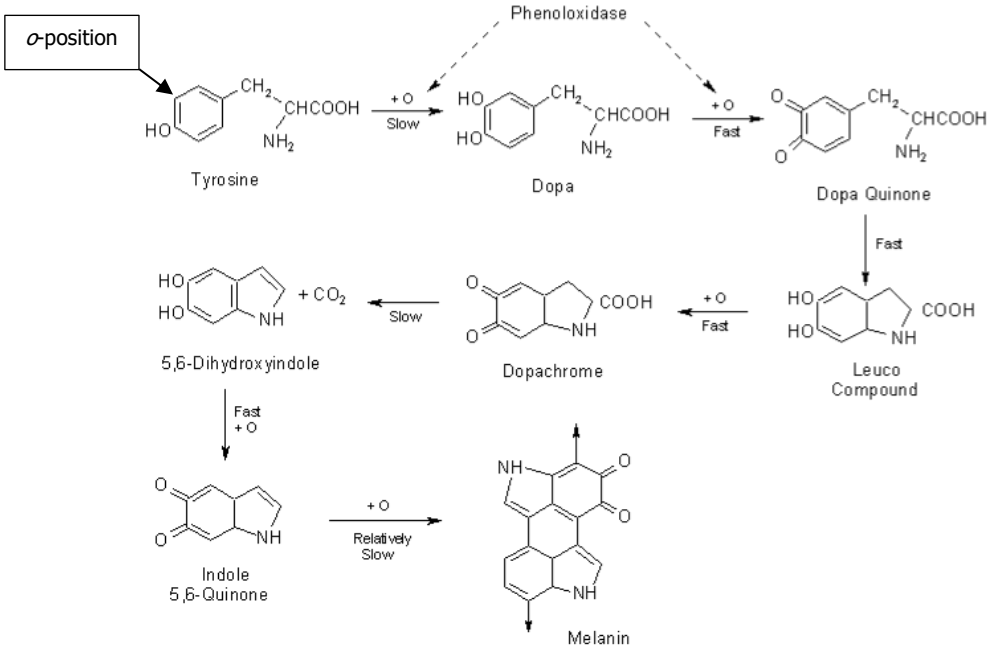



**รูปที่ 3** กระบวนการเกิดสารเมลานินในกุ้ง

(Alex Augusto Gonçalves and Adriene Rosceli Menezes de Oliveira, 2016)

จากรูปที่ 4 กระบวนการเกิดเมลาโนซิส (melanosis) หรือจุดดำในกุ้งนั้นเกิดจากสารที่ชื่อว่าเมลานิน (melanin) โดย PPO จะทำให้เกิดการเติมออกซิเจนในโมเลกุลของ L-tyrosine ออกซิเจนที่เติมเข้าไปจะใช้ในการสร้างหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง o-position ของ hydroxyl group ตัวเดิม ออกซิเจนที่เติมลงไปนี้มาจากอากาศ การเกิดสีดำหรือสีน้ำตาลจึงเกิดบริเวณที่สัมผัสอากาศเท่านั้น หลังการเติม hydroxyl group จะเกิดสารในกลุ่ม quinine ขึ้น ซึ่งสาร quinine ของ L-tyrosine มีชื่อเฉพาะว่า 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) ต่อมา PPO จะทำให้เกิดการเติมออกซิเจนอีกครั้งแต่ออกซิเจนที่เติมลงไปนี้จะไปดึงไฮโดรเจนออกจากโมเลกุลของ quinine ทำให้ได้น้ำ ส่วนสาร quinine ที่เสียโมเลกุลของไฮโดรเจนไปจะกลายเป็นสารกลุ่ม quinone ซึ่งมีชื่อว่า 3,4-dihydroxyphenylalanine quinone (DOPA quinone) สารนี้จะถูกเปลี่ยนโครงสร้างอีกครั้งโดยไม่อาศัยเอนไซม์ใดๆ จะได้สาร Indole-5,6 quinone ขึ้น โดยสารนี้สามารถทำปฏิกิริยากันเอง เกิดเป็นเมลานินสีดำที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและไม่ละลายน้ำ

การเกิดเมลาโนซิสในกุ้งต่างชนิดกันอาจเกิดในบริเวณที่แตกต่างกัน เช่น กุ้งขาวแวนนาไมจะเกิดจุดดำที่หัวก่อนแล้วไล่ลงไปที่หาง แต่ในกุ้งก้ามกรามจะเกิดที่บริเวณหางก่อน (Gomez-Guilen M.C. and Montero M.P., 2007) ส่วนความเร็วในการเกิดเมลาโนซิสนั้นขึ้นกับชนิดของกุ้ง, ปริมาณ L-tyrosine, ปริมาณออกซิเจนที่สัมผัสกุ้ง, ปริมาณ PPO และ activity ของ PPO (Benjakul et al., 2006) นอกจากนี้ความเป็นกรดด่างของเนื้อกุ้งและอุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษายังส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ PPO อีกด้วย




**รูปที่ 4** กระบวนการเกิดสารเมลานิน (melanin) ในกุ้งโดยเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase : PPO)

(สมสมร แก้วบริสุทธิ์ และเพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว, 2552)

**2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาวแวนนาไม**

ยีนที่มีผลต่อการถ่ายทอดลักษณะของยีน ProPO ได้แก่ ProPO1, ProPO2 และ ProPO3 พบว่าในเม็ดเลือดกุ้งมี ProPOs 2 ชนิด คือ ProPO1, ProPO2 ซึ่งพบได้ในกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งชนิดอื่นๆ และ ProPO3 จะพบในพลาสมาของกุ้งกุรุมะ (*Marsupenaeus japonicus*) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากตับ (Masuda et al., 2012) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับ ProPO3 ในกุ้งขาว

ฮีโมไซยานินในกุ้ง (Shrimp hemocyanin, HC) เป็นโปรตีนที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนก๊าซ พบมากในฮีโมลิมพ์ของมอลลัสก์ และอาร์โทรพอด โดยจะถูกเปลี่ยนไปเป็น PO จากการกระตุ้นด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulphate : SDS) จึงส่งผลให้ HC เป็นอีกหนึ่งสาเหตุของการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากการแช่แข็ง (อาจรีย์ เจียวก๊ก และคณะฯ, 2559)

**2.4 การควบคุมการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาวแวนนาไมโดยใช้สารประกอบซัลไฟต์**

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการค้ากุ้งในหลายๆ ประเทศนิยมใช้สารประกอบซัลไฟต์ในการยับยั้งการเกิดเมลาโนซิสในกุ้ง เนื่องจากสารกลุ่มนี้จะไปเปลี่ยนโครงสร้างของเอนไซม์ PPO ทำให้เอนไซม์เสียสภาพการทำงาน สารประกอลซัลไฟต์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารกลุ่ม quinine ให้กลายเป็น quinine-sulfite complexes ทำให้ไม่มีสารกลุ่ม quinine สำหรับใช้สร้างสารเมลานินที่ทำให้เกิดจุดดำ และยังทำหน้าที่เป็น reducing agent โดยจะทำให้สารกลุ่ม quinone เปลี่ยนกลับไปเป็นสารกลุ่ม quinine ที่ไม่มีสี

ซึ่งสารประกอบซัลไฟต์ที่อนุญาตให้ใช้ในกุ้งตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกุ้งแช่แข็ง (มอก.115-2529) ได้แก่ sodium metabisulfite (SMS), potassium metabisulfite, sodium bisulfite, sodium sulfite อาจใช้เพียงชนิดเดียวหรือใช้หลายชนิดร่วมกันก็ได้ แต่ปริมาณที่ใช้ต้องไม่เกิน 100 mg/kg เมื่อคำนวณเป็น sulfur dioxide นอกจากนี้สารประกอบซัลไฟต์ยังสามารถทำลายแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในกุ้งได้ ส่งผลให้กุ้งมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น อย่างไรก็ตามมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบซัลไฟต์ที่สามารถกระตุ้นอาการหอบในผู้ป่วยโรคหอบหืด (asthma) และอาจทำให้เกิดการแพ้ (allergic reaction) ในผู้ป่วยที่ใช้ยาสเตียรอยด์ จึงอาจทำให้สารประกอบซัลไฟต์ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคและคนงานที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปกุ้งได้ (Lee and Whitaker, 1995)

**2.5 ทางเลือกทดแทนการใช้สารประกอบซัลไฟต์เพื่อควบคุมการเกิดเมลาโนซิสในกุ้ง**

นักวิจัยจำนวนมากมีความสนใจและศึกษาการใช้สารยับยั้งการเกิดเมลาโนซิสชนิดอื่นๆ แทนการใช้สารประกอบซัลไฟต์ โดยการทำงานของสารยับยั้งเมลาโนซิสในกุ้งมี 3 แบบ คือ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPO, แข่งขันหรือทำลาย L-tyrosine และออกซิเจน ซึ่งเป็นซับสเตรตของปฏิกิริยา และทำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพหรือทำลายสารกลุ่ม quinine และ quinone รวมทั้งเมลานินที่เกิดขึ้น โดยสามารถแบ่งสารที่ใช้ในการยับยั้งเมลานินออกเป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้

**2.5.1 Reducing agent** เช่น L-ascorbic acid, erythorbic acid, cysteine, glutathione และสารกันหืนกลุ่ม phenolic ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งได้ โดยทำให้สารกลุ่ม quinone ซึ่งมีสีดำเปลี่ยนกลับไปเป็นสารกลุ่ม quinine ที่ไม่มีสี นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารกลุ่ม quinine ได้โดยตรง และเกิดเป็นสารที่เสถียรไม่มีสี ส่วน L-ascorbic acid, erythorbic acid และสารกันหืนกลุ่ม phenolic สามารถจับโมเลกุลออกซิเจนที่เป็นซับสเตรตที่สำคัญของการเกิดเมลาโนซิส และ L-ascorbic acid ยังสามารถจับทองแดงที่ประกอบอยู่ในโครงสร้างของ PPO ทำให้เอนไซม์หมดประสิทธิภาพ

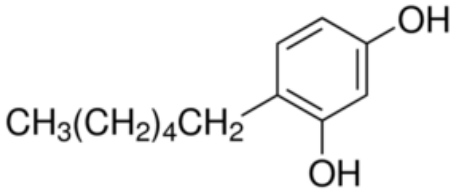
**2.5.2 สารให้กรด (acidulant)** สารกลุ่มนี้จะเพิ่มความเป็นกรดในอาหารส่งผลให้ประจุรวมของโปรตีนโครงสร้างของ PPO เปลี่ยนไป จึงทำให้เอนไซม์สูญเสียประสิทธิภาพ แต่เมื่อระดับความเป็นกรดด่างกลับสู่สภาวะปกติเอนไซม์จะทำงานได้อีกครั้ง การใช้สารให้กรดควรใช้ในปริมาณที่เพียงพอต่อการยับยั้งเอนไซม์เท่านั้น เพราะการใช้สารให้กรดในปริมาณมากเพื่อทำให้เอนไซม์เสียภาพ อาจทำให้อาหารเกิดรสเปรี้ยวและเนื้อสัมผัสของอาหารเปลี่ยนไป สารให้กรดที่นิยมใช้เพื่อควบคุมการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งคือ citric acid

**2.5.3 สาร aromatic carboxylic acid** เช่น benzoic และ cunnamic acid ซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับ L-tyrosine ที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ PPO ทำให้เกิดการแข่งขันกับ L-tyrosine ในการทำปฏิกิริยา ผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาของ aromatic carboxylic acid จะไม่มีสีดำ

จึงไม่ก่อปัญหาใดๆ ส่วน benzoic acid เป็นสารที่สามารถลดปริมาณแบคทีเรียในกุ้งได้ แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของสารนี้ต่อการเกิดเมลาโนซิสในกุ้ง และ cunnamic acid เป็นสารที่พบในอบเชย (cinnamon) ดังนั้นการใช้อบเชยในการหมักกุ้งอาจลดการเกิดเมลาโนซิสได้

**2.5.4 Complexing agent** ได้แก่ cyclodextrins และ chitosan สาร cyclodextrins จะจับ L-tyrosine ซึ่งเป็นซับสเตรตของปฏิกิริยาการเกิดเมลานิน แต่การใช้ cyclodextrins มีข้อจำกัดเพราะสารนี้จะจับสารให้สีและกลิ่นรส ดังนั้นการใช้ cyclodextrins อาจทำให้สีและกลิ่นรสกุ้งลดลง ส่วน chitosan ผลิตจาก chitin ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเปลือกกุ้งและปู chitosan เป็นสารที่มีประจุบวกจำนวนมากทำให้สามารถจับ PPO ได้โดยตรงส่งผลให้เอนไซม์เสียประสิทธิภาพ นอกจากนี้ chitosan ยังสามารถจับ L-tyrosine รวมทั้งสารกลุ่ม quinine และ quinone ได้อีกด้วย

**2.5.5 4-Hexylresorcinol** หรือที่รู้จักกันในชื่อ 4-Hexyl-1,3-benzenediol และ Hexylresorcinol เป็นสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร มีสูตรทางเคมี คือ $C_{12}H_{18}O_2$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 197.24 g/mol เป็นผงสีขาว ละลายได้ดีในอีเทอร์และแอลกอฮอลล์ แต่ละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Food and Argriculture Organization of the United Nations, 2006)




**รูปที่ 5** โครงสร้างทางเคมีของ 4-Hexylresorcinol

ที่มา : https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/209465?lang=en&region=TH

ในปัจจุบันเริ่มมีการนำ 4-Hexylresorcinol มาใช้ในอุตสาหกรรมกุ้งเพิ่มมากยิ่งขึ้น ทดแทนการใช้สารประกอบซัลไฟต์ เพื่อชะลอการเกิดเมลาโนซิสหรือจุดดำในกุ้ง เนื่องจาก 4-Hexylresorcinol มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ L-tyrosine ที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ PPO ทำให้สามารถไปแย่ง L-tyrosine ในการเกิดปฏิกิริยา ส่งผลให้ L-tyrosine ทำปฏิกิริยาและเกิดสารเมลานินที่ทำให้เกิดจุดดำในกุ้งได้น้อยลง ซึ่งสารชนิดนี้มีความปลอดภัยมากกว่าสารประกอบซัลไฟต์ ไม่ทำให้เกิดการฟอกสี มีความเสถียรและมีประสิทธิภาพที่ความเข้มข้นต่ำ โดยการแช่กุ้งในสารละลาย 4-Hexylresorcinol เข้มข้น 0.25% ก็สามารถยับยั้งการเกิดเมลาโนซิสและยืดอายุการเก็บรักษากุ้งได้ (Lopez-Caballero et al., 2006) แต่การใช้สาร 4-Hexylresorcinol ในสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง (crustacean) ต้องใช้ตามปริมาณ ADI คือ สามารถใช้ได้ที่ความเข้มข้นสูงถึง 50 ppm จะทำให้มีสารนี้ตกค้างในผลิตภัณฑ์ประมาณ 1 mg/1 kg ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นปริมาณที่ไม่เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค (Food and Argriculture Organization of the United Nations, 2006)

# บทที่ 3

# วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

## 3.1 ตัวอย่าง

กุ้งขาวแวนนาไม

## 3.2 สารเคมี

3.2.1 4-Hexylresorcinol (4-HR)

3.2.2 Sodium metabisulfite (SMS)

3.2.3 Trizol

3.2.4 Chloroform

3.2.5 Isopropanol

3.2.6 75% Ethanol

3.2.7 Nuclease free water

3.2.8 Oligo (dT) primer

3.2.9 5X Reaction Buffer

3.2.10 10 mM dNTP Mix

3.2.11 Ribolock

3.2.12 RevertAid

3.2.13 PCR water

3.2.14 10X Buffer w/$(NH_4)_2SO_4$

3.2.15 25 mM $MgCl_2$

3.2.16 1 mM dNTP

3.2.17 Forward Elongation factor 1-alpha Primer (EF1$\alpha$/F)

3.2.18 Reverse Elongation factor 1-alpha Primer (EF1$\alpha$/R)

3.2.19 Forward *Lv*ProPO1 Primer (*Lv*ProPO1/F)

3.2.20 Reverse *Lv*ProPO1 Primer (*Lv*ProPO1/R)

3.2.21 Forward *Lv*ProPO2 Primer (*Lv*ProPO2/F)

3.2.22 Reverse *Lv*ProPO2 Primer (*Lv*ProPO2/R)

3.2.23 Tris Hydrochloride

3.2.24 Taq DNA polymerase

3.2.25 Ethidium bromide

3.2.26 0.3% Dopamine

**3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ**

3.3.1 เข็มฉีดยา

3.3.2 ลังโฟม

3.3.3 ถ้วยตวง 1000 ml

3.3.4 เครื่องชั่งสาร

3.3.5 ตู้เย็นอุณหภูมิ -80, -20 และ 4 ℃

3.3.6 ไมโครเวฟ

3.3.7 ขวดรูปชมพู่

3.3.8 Micro tube 1.5 ml

3.3.9 Micropipette

3.3.10 Pipette tips

3.3.11 Vortex Mixer

3.3.12 Thermocycler

3.3.13 Centrifuge

3.3.14 Gel box

3.3.15 Power supply

3.3.16 Gel electrophoresis

3.3.17 Gel Casting Stand

3.3.18 Gel Tray

3.3.19 Comb

3.3.20 Rack

3.3.21 Parafilm

3.3.22 Gel documentation

3.3.23 PCR tube with flat cap

3.3.24 Nanodrop

3.3.25 96-well microplate

3.3.26 Spectrophotometer

3.3.27 Microplate reader

**3.4 การดำเนินการทดลอง**

**3.4.1 การเตรียมกุ้งขาว**

3.4.1.1 คัดเลือกกุ้งขาวแวนนาไมที่มีขนาดเท่ากัน (น้ำหนักประมาณ 10 g) จำนวน 18 ตัว

3.4.1.2 แบ่งกุ้งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนละ 6 ตัว นำมาเลี้ยงในอ่างน้ำเกลือเข้มข้น 20 ppt ปริมาตร 3 L เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยอ่างที่ 1 จะเป็นชุดควบคุม (control), อ่างที่ 2 สำหรับแช่สารละลาย SMS และอ่างที่ 3 สำหรับแช่สารละลาย 4-HR

**3.4.2 การยับยั้งการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาว**

3.4.2.1 เตรียม stock solution ของ SMS ความเข้มข้น 3% (w/v) โดยชั่ง SMS 1.50 g ละลายในน้ำเกลือความเข้มข้น 20 ppt 50 ml

3.4.2.2 เตรียม stock solution ของ 4-HR ความเข้มข้น 3,000 ppm โดยชั่ง 4-HR 0.15 g ละลายในน้ำเกลือความเข้มข้น 20 ppt 50 ml ที่แบ่งมาจากอ่างที่ 3 ในข้อ 3.4.2.1

3.4.2.3 เมื่อครบ 12 ชั่วโมง ให้เท stock solution ของ SMS ที่เตรียมไว้ลงในอ่างที่ 2 ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลาย SMS ความเข้มข้น 0.05% (w/v) และเท stock solution ของ 4-HR ลงในอ่างที่ 3 ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลาย 4-HR ความเข้มข้น 15 ppm และเลี้ยงกุ้งในสารละลายทั้งสองชนิด 30 นาที

**3.4.3 การเก็บตัวอย่างเลือด**

3.4.3.1 เก็บเลือดกุ้งตัวละ 100 µl ลงในสารสกัดอาร์เอ็นเอ Trizol 100 µl

3.4.3.2 นำตัวอย่างเลือดไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 ℃

**3.4.4 การสกัด RNA**

3.4.4.1 เติมสารสกัดอาร์เอ็นเอ Trizol 900 µl ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 2 นาที

3.4.4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 5 นาที

3.4.4.3 แยกส่วนใสใส่ Microtube

3.4.4.4 เติม Chloroform 200 µl ใส่หลอด นำไป vortex เป็นเวลา 2 นาที

3.4.4.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 15 นาที แล้วแยกส่วนใสใส่หลอดใหม่

3.4.4.6 เติม Isopropanol 500 µl เขย่าให้เข้ากัน

3.4.4.7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -80 ℃ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.4.8 ดูดส่วนใสทิ้ง เติม 75% Ethanol 1,000 µl

3.4.4.9 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 10 นาที

3.4.4.10 ดูด 75% Ethanol ทิ้ง และเปิดฝาหลอดเพื่อระเหย 75% Ethanol ประมาณ 5 นาที

3.4.4.11 ละลายตะกอนด้วย Nuclease free water 50 µl เขย่าผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.4.12 นำไปวัดความเข้มข้น RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop

3.4.4.13 เก็บสารสกัด RNA ที่อุณหภูมิ -80 °C

**3.4.5 การสร้าง cDNA**

3.4.5.1 เตรียม RNA 250 ng ใส่หลอด PCR

3.4.5.2 นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่อง PCR เมื่อครบเวลาให้นำไปแช่น้ำแข็งทันที

3.4.5.3 เตรียม Master Mix 8 µl ใส่ลงในหลอดที่มี RNA

| สาร | 1X (µl) |
|---|---|
| 5X Reaction Buffer | 4 |
| 10 mM dNTP Mix | 2 |
| Ribolock | 1 |
| RevertAid | 1 |
| ปริมาตรรวม | 8 |

3.4.5.4 นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 25 °C 15 นาที, 42 °C 90 นาที, 72 °C 15 นาที และ 12 °C 10 นาที

3.4.5.5 ย้ายใส่ Microtube

3.4.5.6 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

**3.4.6 การทำ PCR**

3.4.6.1 เจือจาง cDNA ด้วยอัตราส่วน cDNA 1 µl และ PCR water 9 µl (1:10)

3.4.6.2 เตรียม Master mix ของ EF1$\alpha$ ลงในหลอด PCR

| สาร | 1X (µl) |
|---|---|
| PCR water | 11.3 |
| 10X Buffer w/$(NH_4)_2SO_4$ | 2.5 |
| 25 mM $MgCl_2$ | 1.5 |
| 1 mM dNTP | 2.5 |
| EF1$\alpha$/F | 2.5 |
| EF1$\alpha$/R | 2.5 |
| Tag DNA polymerase | 0.2 |
| cDNA เจือจาง 1:10 | 2 |
| ปริมาตรรวม | 25 |

3.4.6.3 เตรียม Master mix ของ *Lv*ProPO1 ลงในหลอด PCR

| **สาร** | **1X (µl)** |
|---|---|
| PCR water | 11.3 |
| 10X Buffer w/$(NH_4)_2SO_4$ | 2.5 |
| 25 mM $MgCl_2$ | 1.5 |
| 1 mM dNTP | 2.5 |
| *Lv*ProPO1/F | 2.5 |
| *Lv*ProPO1/R | 2.5 |
| Tag DNA polymerase | 0.2 |
| cDNA เจือจาง 1:10 | 2 |
| ปริมาตรรวม | 25 |

3.4.6.4 เตรียม Master mix ของ *Lv*ProPO2 ลงในหลอด PCR

| **สาร** | **1X (µl)** |
|---|---|
| PCR water | 11.3 |
| 10X Buffer w/$(NH_4)_2SO_4$ | 2.5 |
| 25 mM $MgCl_2$ | 1.5 |
| 1 mM dNTP | 2.5 |
| *Lv*ProPO2/F | 2.5 |
| *Lv*ProPO2/R | 2.5 |
| Tag DNA polymerase | 0.2 |
| cDNA เจือจาง 1:10 | 2 |
| ปริมาตรรวม | 25 |

3.4.6.5 ทำ PCR โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

| **ขั้นตอน** | **อุณหภูมิ (°C )** | **เวลา** | **จำนวนรอบ** |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation | 94 | 1 นาที | |
| Denaturation | 94 | 30 วินาที | EF1**α** รัน 22 รอบ, *Lv*ProPO1 และ *Lv*ProPO2 รัน 25 รอบ |
| Annealing | 55 | 30 วินาที | |
| Extension | 72 | 30 วินาที | |
| Post amplification | 72 | 5 นาที | |

3.4.6.6 เตรียม Agarose gel 1.8% โดยใช้ TBE buffer เป็นตัวทำละลาย

3.4.6.7 นำตัวอย่างที่ผสมแล้วใส่ลงใน well โดยผสม dye 2 µl และตัวอย่าง PCR 8 µl

3.4.6.8 ย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide (EtBr) เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำโดยแช่ทิ้งไว้ 15 นาที

3.4.6.9 นำแผ่นเจลไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel documentation ร่วมกับโปรแกรม GeneSys จะได้แถบแบนของยีน

**3.4.7 การวัดค่าการแสดงออกของยีน**

3.4.7.1 นำแถบแบนที่ได้ไปวัดค่าการแสดงออกของยีน (mRNA expression) ด้วยโปรแกรม Gel Pro 3.1 simple analysis

3.4.7.2 คำนวณค่าการแสดงออกของยีน (Relative mRNA expression) ของยีน *Lv*ProPO1 และ *Lv*ProPO2 จากสูตร

$$Relative\ mRNA\ expression = \frac{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } Lv\text{ProPO1 หรือ } Lv\text{ProPO2}}{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } \text{EF1}\alpha}$$

**3.4.8 การวัดค่ากิจกรรมของยีน (PO activity)**

**3.4.8.1 การวัดความเข้มข้นของโปรตีนในเลือด**

3.4.8.1.1 ผสมสารตามตารางสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

| Standard BSA (µg) | ปริมาตร 2 mg/ml BSA ที่ใช้ (µl) | PCR water (µl) | Bradford (ml) |
|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 20 | 1 |
| 1.25 | 0.625 | 19.375 | 1 |
| 2.5 | 1.25 | 18.75 | 1 |
| 5 | 2.5 | 17.5 | 1 |
| 10 | 5 | 15 | 1 |

3.4.8.1.2 สำหรับตัวอย่างเลือดกุ้งให้ผสมเลือดกุ้ง 1 µl, PCR water 19 µl และ Bradford 1 ml

3.4.8.1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ทั้ง BSA และตัวอย่าง

3.4.8.1.4 สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน

3.4.8.1.5 คำนวณความเข้มข้นโปรตีนในตัวอย่างเลือดจากกราฟมาตรฐาน

**3.4.8.2 การวัด PO activity**

3.4.8.2.1 คำนวณปริมาณเลือดที่ต้องใช้ โดยให้แต่ละตัวอย่างมีโปรตีน 500 µg

3.4.8.2.2 ใส่ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

3.4.8.2.3 ใส่ตัวอย่างเลือด

3.4.8.2.4 ใส่ RO water เพื่อปรับปริมาตร

3.4.8.2.5 ใส่ 0.01, 0.1 และ 1% SMS และ 0.01, 0.1 และ 1% 4-HR รอบ่ม 5 นาที

3.4.8.2.6 ใส่ 0.3% Dopamine ปริมาตร 26 µl

3.4.8.2.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm

3.4.8.2.8 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณ PO activity จากสูตร

$$PO\ activity = \frac{Absorbance\ at\ 470\ nm - blank}{protein\ 500\ \mu g\ \ x\ time\ (min)}\ x\ 100$$

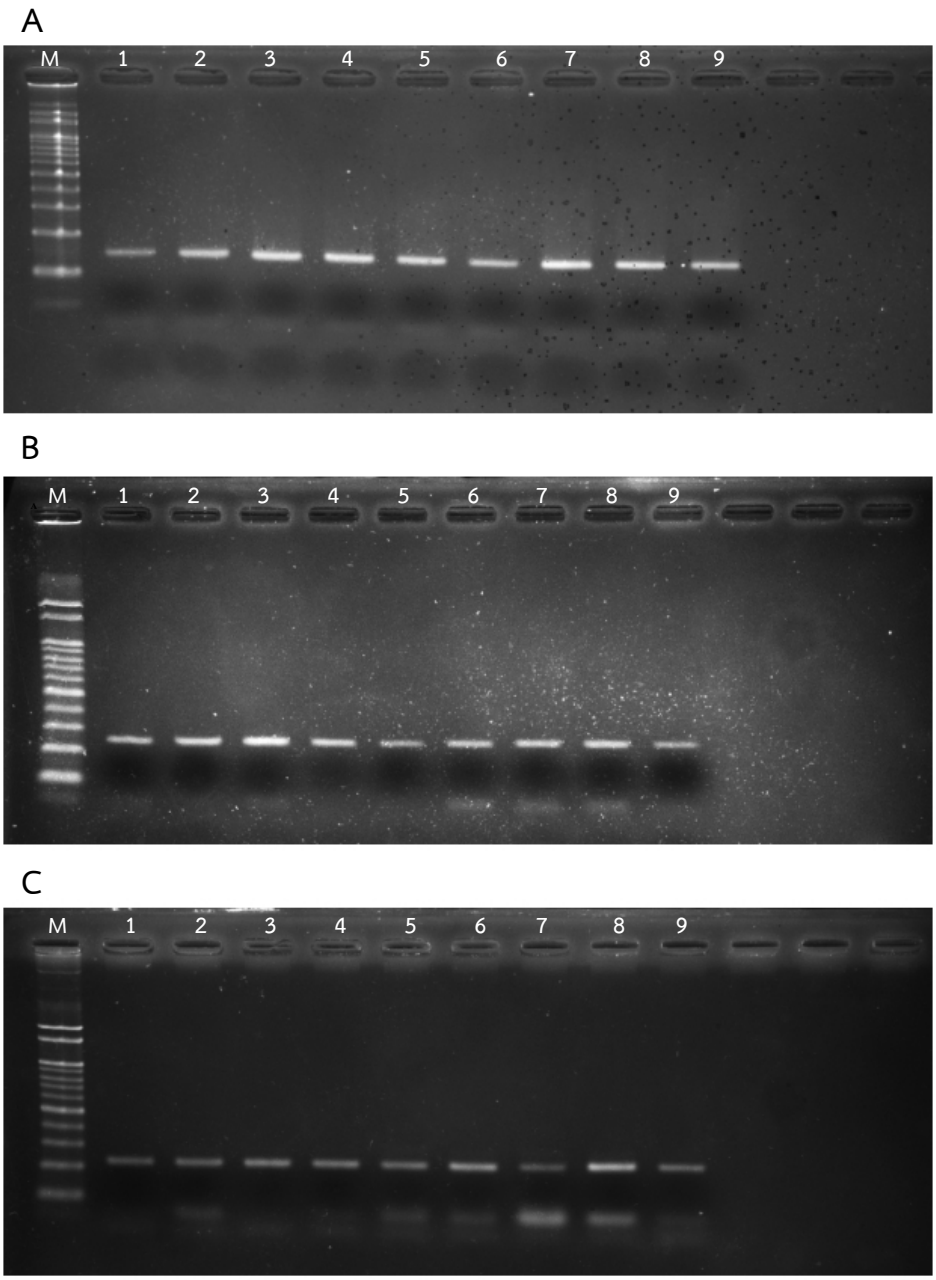
**3.4.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ**

ในการทดลองมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำซ้ำ 3 ครั้งในทุกๆ ขั้นตอน ใช้การวิเคราะห์ Analysis of variance (ANOVA) โดยใช้การคำนวณแบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS statistical package version 22.0

# บทที่ 4

# ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and discussion)

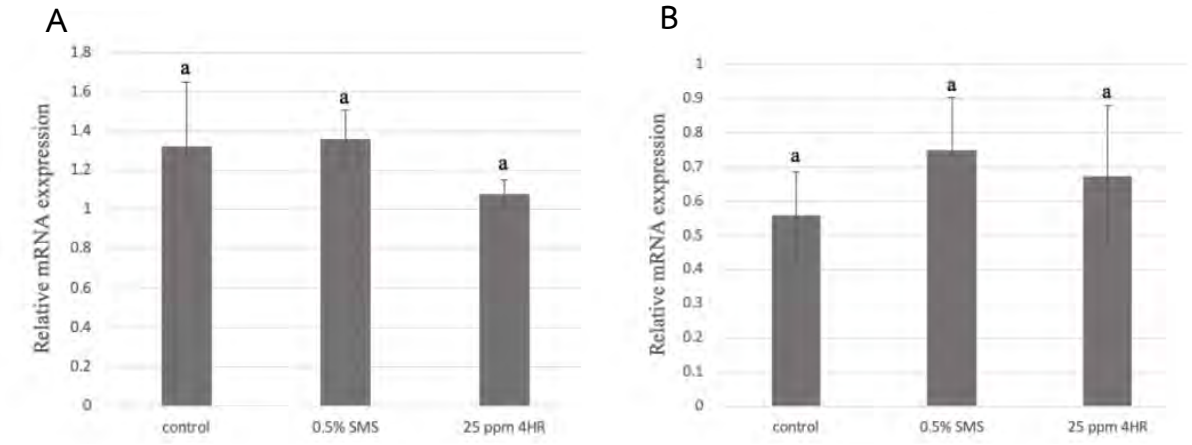
## 4.1 ผลการทำ PCR




**รูปที่ 6** ผลการทำ PCR ของยีน EF1$\alpha$ (A), ผลการทำ PCR ของยีน ProPO1 (B) และผลการทำ PCR ของยีน ProPO2 (C) โดย M: 100 bp DNA, 1: ชุดควบคุมตัวอย่างที่ 1, 2: ชุดควบคุมตัวอย่างที่ 2, 3: ชุดควบคุมตัวอย่างที่ 3, 4: 0.5% SMS ตัวอย่างที่ 1, 5: 0.5% SMS ตัวอย่างที่ 2, 6: 0.5% SMS ตัวอย่างที่ 3, 7: 25 ppm 4-HR ตัวอย่างที่ 1, 8: 25 ppm 4-HR ตัวอย่างที่ 2, 9: 25 ppm 4-HR ตัวอย่างที่ 3 ซึ่งชุดควบคุม: ไม่มีสารใดๆ, SMS: สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์, 4-HR: สารละลาย 4-Hexylresorcinol

รูปแบบการแสดงออกของยีน EF1$\alpha$ แสดงดังรูปที่ 6A ที่ใช้เป็นยีนควบคุม กับตัวอย่างชุดควบคุม จำนวน 3 ตัวอย่าง, ชุด SMS จำนวน 3 ตัวอย่าง และชุด 4-HR จำนวน 3 ตัวอย่าง จากผลแสดงให้เห็นว่า ยีน EF1$\alpha$ มีการแสดงออกในทุกตัวอย่าง และการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO1 และ *Lv*ProPO2 ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส แสดงดังรูปที่ 6B และ 6C ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ยีน *Lv*ProPO1 และ *Lv*ProPO2 มีการแสดงออกในทุกตัวอย่าง ที่ระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน

**4.2 ผลการวัดการแสดงออกของยีน**



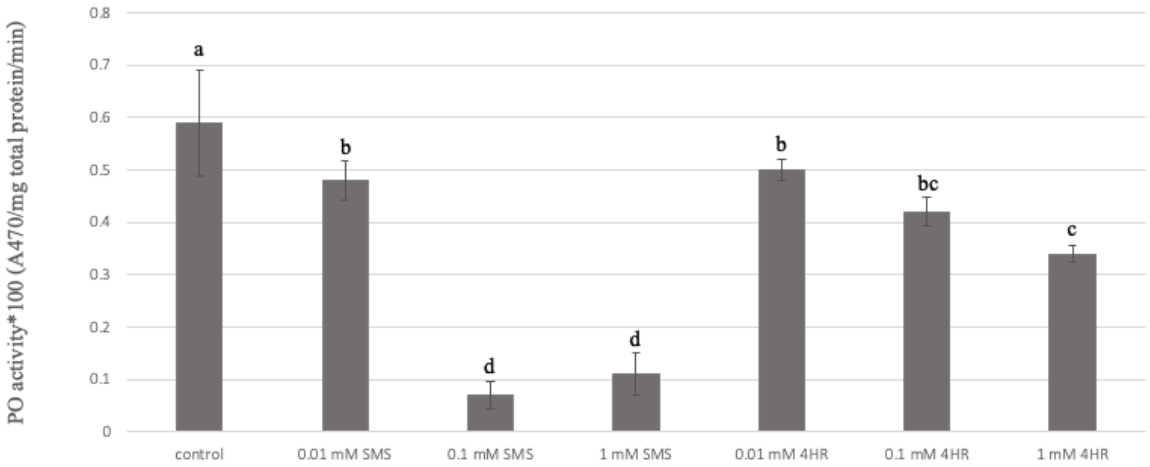

**รูปที่ 7** การแสดงออกของยีน ProPO1 (A) และการแสดงออกของยีน ProPO2 (B) โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันที่แสดงบนแถบคือการแสดงออกของยีนระหว่างชุดทดสอบมีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ซึ่งชุดควบคุม: ไม่มีสารใดๆ, 0.5% SMS: สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ความเข้มข้น 0.5%, 25 ppm 4-HR: สารละลาย 4-Hexylresorcinol ความเข้มข้น 25 ppm

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Lv*proPO1 และ *Lv*proPO2 ในตัวอย่างกุ้งที่แช่ในสารละลาย 0.5% SMS และ 25 ppm 4-HR เทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 7) พบว่าระดับการแสดงออกจากมีแนวโน้มที่ลดลงหรือเพิ่มขึ้นในบางกลุ่มตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่า ค่าการแสดงออกของยีน *Lv*proPO1 และ *Lv*proPO2 ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P≥0.05) จากผลชี้ให้เห็นว่าสารยับยั้งเมลาโนซิส SMS และ 4-HR ไม่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนในระบบโพรฟีนอล-ออกซิเดสในระดับยีน ซึ่งอาจจะมีความปลอดภัยในระดับนึงต่อการใช้งาน

**4.3 ผลการแสดงค่ากิจกรรมของยีน (PO activity)**

จากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งขาว กับชุดที่ทดสอบด้วยสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR และ SMS ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM (รูปที่ 8) พบว่าระหว่างกลุ่มชุดควบคุมกับกลุ่ม SMS หรือระหว่างกลุ่มชุดควบคุมกับกลุ่ม 4-HR มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยที่ความเข้มข้นของสารสูงสุดที่ทดลอง คือ 1 mM ของ กลุ่ม SMS จะสามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้มากกว่ากลุ่ม 4-HR ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR และ SMS สามารถควบคุม

กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวได้ และยังแสดงให้เห็นว่าระบบโพรฟีนอลออกซิเดสมีความสำคัญต่อการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาว




**รูปที่ 8** ค่ากิจกรรมของยีน (PO activity) โดยตัวอักษรที่แสดงบนแถบที่แตกต่างกันคือค่ากิจกรรมของยีนระหว่างชุดทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งชุดควบคุม: ไม่มีสารใดๆ, 0.01 mM SMS, 0.1 mM SMS และ 1% SMS: สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ตามลำดับ, 0.01 mM 4-HR, 0.1 mM 4-HR และ 1% 4-HR: สารละลาย 4-Hexylresorcinol ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ตามลำดับ

# บทที่ 5

## สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความเกี่ยวข้องของระบบโพรฟีนอลออกซิเดสต่อการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาว พบว่าสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR และ SMS ไม่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนโพรฟีนอลออกซิเดสทั้ง *Lv*ProPO1 และ *Lv*ProPO2 ของกุ้งขาว อย่างไรก็ตามค้นพบว่าสารยับยั้งเมลาโนซิส 4-HR และ SMS สามารถควบคุมการลดเมลาโนซิสได้โดยการลดกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวได้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ระบบโพรฟีนอลออกซิเดสมีความสำคัญต่อการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาว ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาสารยับยั้งเมลาโนซิสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทะเลต่อไป

# เอกสารอ้างอิง

กมลศิริ พันธนียะ. กุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม. [ออนไลน์]. 2555. แหล่งที่มา: https://www.shrimpcenter.com/t-shrimp051.html [15 กันยายน 2562]

กรกวี ศรีอินทร์. การศึกษาคุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาวในระบบปิดในพื้นที่ อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2559.

กระทรวงพาณิชย์. เอฟทีเอทลายกำแพงภาษี ดันไทยขึ้นที่2 ส่งออกประมงโลก .[ออนไลน์]. 2562. แหล่งที่มา: http://www.aseanthai.net/ewt_news.php?nid=8991&filename=in [15 กันยายน 2562]

จิราพร เทศนุ้ย. การวิเคราะห์และการจัดการปัญหาการเกิดจุดขาวในเปลือกกุ้งขาวแวนนาไมระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาการจัดการเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2557.

นิรชา วงษ์จินดา. กระบวนการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็ง. [ออนไลน์]. 2561. แหล่งที่มา: https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20170120161723_file.pdf [16 กันยายน 2562]

ประภัสสร แสนธิ และเปรมวดี เทพวงศ์. ผลของการสกัดจากส่วนเหลือจากการตัดแต่งเห็ดหอมต่อการเกิดเมลาโนซิสและการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกุ้งขาวระหว่างการเก็บรักษาด้วยน้ำแข็ง. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53, หน้า 1192-1202, 3-6 กุมภาพันธ์ 2558 ณ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน), 2558.

วีระเดช คชเสนีย์. กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศเผยความตกลงเอฟทีเอ ช่วยปลดล็อคกำแพงภาษีให้กับสินค้าประมงและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลของไทย ผลักดันการส่งออกขยายตัวเพิ่มขึ้นในทุกตลาดส่งไทยเป็นผู้ส่งออกอันดับ 2 ของโลก [บทวิทยุออกอากาศทางสถานีวิทยุกระจายเสียงแห่งประเทศไทย] .23 พฤษภาคม 2562.

วลัยกร นิจยพัฒน์. วิทยาศาสตร์ของสี. วารสารคหกรรมศาสตร์ มศว 13 (ตุลาคม 2557-มีนาคม 2558) : 3-11.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. ส่องทางรอดส่งออกอาหารทะเลแปรรูปไทย. [ออนไลน์]. 2560. แหล่งที่มา: https://www.kasikornbank.com/th/business/sme/KSMEKnowledge/article/KSMEAnalysis/Documents/Seafood2017.pdf [16 กันยายน 2562]

สมสมร แก้วบริสุทธิ์ และเพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. ความเป็นไปได้ของการควบคุมการเกิดจุดดำจากเมลานินในกุ้งโดยไม่ใช้สารกลุ่มซัลไฟต์. วารสารแก่นเกษตร 38 (2553) : 85-94.

สามารถ สายอุต .การเกิดจุดดำในกุ้ง .[ออนไลน์] .2561. แหล่งที่มา: http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/topic.asp?TOPIC_ID=7531 [15 กันยายน 2562]

อาจรีย์ เจียวก๊ก, พรรณี อัศวตรีรัตนกุล และประภาพร อุทารพันธุ์. การพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ (8 มกราคม – เมษายน 2559) : 79-89.

Alex, A.G., and Adriene, R.M. de Oliveira. Melanosis in crustaceans: A review. LWT-Food Science and Technology 65 (January 2016) : 791-799.

Angle, B.E., Fagutao,F., Orapint, J., and Wanchai, W. Application of ergothioneine-rich extract from an edible mushroom *Flammulina velutipes* for melanosis prevention in shrimp, *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. Food Research International 45 (2012) : 232-237.

Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tanaka, M. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). Journal of Food Biochem 29 (2006) : 470-485.

Food and Argriculture Organization of the United Nations. 4-Hexylresorcinol**.** [ออนไลน์] . 2006. Available from : http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-227.pdf [2019, September 15]

Gokoglu, N., and Yerlikaya, P. Inhibition effects of grape seed extracts on melanosis formation in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). International Journal of Food Science & Technology 43 (2008) : 1004-1008.

Gomez, G., and Montero, M.P. Polyphenol uses in seafood conservation. American Journal of Food Technology 2 (2007) : 593-601.

Kohsuke, A., Hirotoshi, E., Toshiki, W., Takaaki,. N., and Takashi, H. Hemocyanin in theexoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization. Pigment Cell & Melanoma Research 18 (2005) : 136-143

Lee, C.Y., and Whitaker, J.R. Enzymatic browning reaction and its prevention, Washington, DC : American Chemical Society Publications, 1995 อ้างอิงใน สมสมร แก้วบริสุทธิ์ และเพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. ความเป็นไปได้ของการควบคุมการเกิดจุดดำจากเมลานินในกุ้งโดยไม่ใช้สารกลุ่มซัลไฟต์. วารสารแก่นเกษตร 38 (2553) : 85-94.

Lopez-Caballero, M.E., Martinez-Alvarez, O., Gomez-Guillen, M.C., and Montero, P. Quality of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) treated with a 4-hexylresorcinol-based formulation. European Food Research and Technology 222 (2006) : 425-431.

Martinez-Alvarez, O., Lopez-Caballero, M.E., Gomez-Guillen, M.C., and Montero, P. The effect of several cooking treatments on subsequent chilled storage of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with different melanosis inhibiting formulas. LWT-Food Science and Technology 42 (2009) : 1335-1344.

Piti, A., Walaiporn, C., and Anchalee, T. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Developmental and Comparative Immunology 33 (2009) : 247-256

Radha, L., Craig W.B., and Arthur J.M. 4-Hexylresorcinol and Prevention of Shrimp Blackspot. Journal of Food Composition and Analysis 4 (March 1991) : 148-157.

Rotllant, G., Arnau, F., Garcia, J.A., Garcia, N., Rodriguez, M., and Sarda, F. Effect of metabisulphite treatments and freezing on melanosis inhibition in rose shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). Food Science and Technology International 8 (2002) : 243-247.

Thepnuan, R., Benjakul, S.,and Visessangguan, W. Effect of pyrophosphate and 4-hexylresorcinol pretreatment on quality of refrigerated white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) kept under modified atmosphere packaging. Journal of Food Science 73 (2008) : 124-133.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

# ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

## ก.1 ความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของ RNA

| ตัวอย่าง | | Nucleic Acid Conc (ng/µl) | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 1 | 118.7 | 2.968 | 1.625 | 1.83 | 0.4 |
| | 2 | 116.6 | 2.914 | 1.662 | 1.75 | 0.25 |
| | 3 | 80.5 | 2.013 | 1.149 | 1.75 | 0.54 |
| 0.05% SMS | 1 | 122.1 | 3.052 | 1.738 | 1.76 | 0.72 |
| | 2 | 104 | 2.6 | 1.437 | 1.81 | 0.55 |
| | 3 | 162.5 | 4.062 | 2.229 | 1.82 | 1.18 |
| 25 ppm 4-HR | 1 | 140.2 | 3.505 | 2.004 | 1.75 | 0.89 |
| | 2 | 107.8 | 2.696 | 1.582 | 1.7 | 1.28 |
| | 3 | 79.9 | 1.999 | 1.130 | 1.77 | 1.63 |

## ก.2 การแสดงออกของยีน (mRNA expression) ด้วยโปรแกรม Gel Pro 3.1 simple analysis

ตารางที่ 2 การแสดงออกของยีน EF1$\alpha$

| ครั้ง | ตัวอย่าง | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | | | 0.05% SMS | | | 25 ppm 4-HR | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 22.371 | 21.469 | 41.168 | 23.018 | 20.895 | 19.836 | 26.687 | 24.820 | 23.017 |
| 2 | 22.386 | 21.439 | 41.136 | 23.018 | 20.927 | 19.836 | 27.286 | 24.820 | 22.673 |
| 3 | 22.284 | 21.439 | 41.136 | 23.018 | 20.927 | 19.836 | 27.286 | 24.768 | 23.017 |
| เฉลี่ย | 22.347 | 21.449 | 41.147 | 23.018 | 20.916 | 19.836 | 27.086 | 24.803 | 22.902 |

ตารางที่ 3 การแสดงออกของยีน *Lv*ProPO1

| ครั้ง | ตัวอย่าง | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | | | 0.05% SMS | | | 25 ppm 4-HR | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 33.428 | 32.682 | 38.777 | 33.856 | 25.114 | 28.118 | 27.916 | 28.725 | 24.65 |
| 2 | 33.367 | 32.682 | 38.777 | 33.856 | 25.046 | 28.118 | 27.916 | 28.725 | 23.413 |
| 3 | 33.428 | 32.682 | 38.777 | 33.856 | 25.046 | 28.118 | 27.916 | 28.725 | 24.629 |
| เฉลี่ย | 33.408 | 32.682 | 38.777 | 33.856 | 25.069 | 28.118 | 27.916 | 28.725 | 24.231 |

ตารางที่ 4 การแสดงออกของยีน *Lv*ProPO2

| ครั้ง | ตัวอย่าง | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | | | 0.05% SMS | | | 25 ppm 4-HR | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 12.819 | 14.619 | 17.447 | 14.916 | 14.095 | 18.138 | 12.119 | 20.945 | 16.809 |
| 2 | 12.748 | 14.453 | 17.376 | 14.838 | 13.991 | 18.515 | 11.944 | 20.826 | 16.656 |
| 3 | 12.767 | 14.451 | 17.395 | 14.858 | 14.02 | 18.539 | 12.012 | 20.903 | 16.772 |
| เฉลี่ย | 12.778 | 14.508 | 17.406 | 14.871 | 14.035 | 18.397 | 12.025 | 20.891 | 16.746 |

**ก.2 ค่าการคำนวณการแสดงออกของยีน (Relative mRNA expression)**

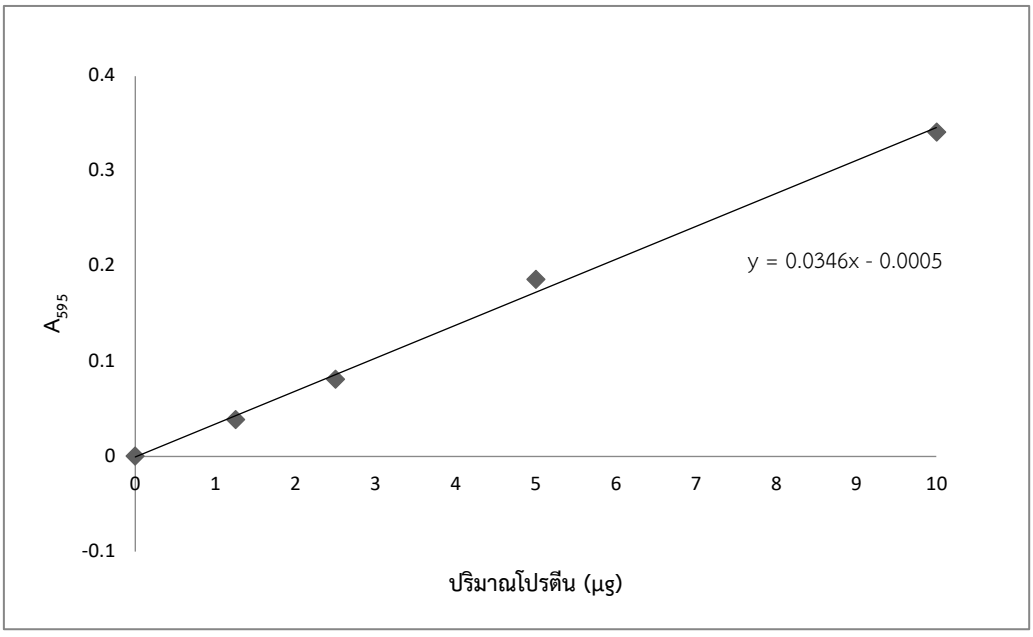
ตารางที่ 5 ค่าการคำนวณการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO1

| | ตัวอย่าง | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | | | 0.05% SMS | | | 25 ppm 4-HR | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Relative mRNA expression | 1.495 | 1.524 | 0.942 | 1.471 | 1.199 | 1.418 | 1.031 | 1.158 | 1.058 |
| เฉลี่ย | 1.320 | | | 1.362 | | | 1.082 | | |
| Std | 0.327626988 | | | 0.144319179 | | | 0.067127412 | | |

ตารางที่ 6 ค่าการคำนวณการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO2

| | ตัวอย่าง | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | | | 0.05% SMS | | | 25 ppm 4-HR | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Relative mRNA expression | 0.572 | 0.676 | 0.423 | 0.646 | 0.671 | 0.927 | 0.444 | 0.842 | 0.731 |
| เฉลี่ย | 0.557 | | | 0.748 | | | 0.672 | | |
| Std | 0.12731899 | | | 0.155772893 | | | 0.205560743 | | |

**ก.3 กราฟปริมาณโปรตีนมาตรฐาน**




**รูปที่ 9** กราฟโปรตีนมาตรฐาน

**ก.4 กิจกรรมของยีน (PO activity)**

ตารางที่ 7 กิจกรรมของยีน (PO activity) ที่เวลา 30 นาที

| 30 min | ตัวอย่าง | $A_{470}$ ที่ 30 min | หัก blank 0.04 | หาร protein 0.5 mg | หารเวลา 30 min | PO activity *100 ($A_{470}$/ mg total protein/min) | เฉลี่ย | Std. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| control | 1 | 0.111 | 0.071 | 0.142 | 0.00473333 | 0.47 | 0.59 | 0.100885 |
| | 2 | 0.14 | 0.1 | 0.2 | 0.00666667 | 0.67 | | |
| | 3 | 0.133 | 0.093 | 0.186 | 0.0062 | 0.62 | | |
| 0.01 mM SMS | 1 | 0.119 | 0.079 | 0.158 | 0.00526667 | 0.53 | 0.48 | 0.036717 |
| | 2 | 0.109 | 0.069 | 0.138 | 0.0046 | 0.46 | | |
| | 3 | 0.11 | 0.07 | 0.14 | 0.00466667 | 0.47 | | |
| 0.1 mM SMS | 1 | 0.049 | 0.009 | 0.018 | 0.0006 | 0.06 | 0.07 | 0.02524 |
| | 2 | 0.048 | 0.008 | 0.016 | 0.00053333 | 0.05 | | |
| | 3 | 0.055 | 0.015 | 0.03 | 0.001 | 0.10 | | |
| 1 mM SMS | 1 | 0.055 | 0.015 | 0.03 | 0.001 | 0.10 | 0.11 | 0.040734 |
| | 2 | 0.063 | 0.023 | 0.046 | 0.00153333 | 0.15 | | |
| | 3 | 0.051 | 0.011 | 0.022 | 0.00073333 | 0.07 | | |
| 0.01 mM 4-HR | 1 | 0.118 | 0.078 | 0.156 | 0.0052 | 0.52 | 0.50 | 0.02143 |
| | 2 | 0.112 | 0.072 | 0.144 | 0.0048 | 0.48 | | |
| | 3 | 0.117 | 0.077 | 0.154 | 0.00513333 | 0.51 | | |
| 0.1 mM 4-HR | 1 | 0.104 | 0.064 | 0.128 | 0.00426667 | 0.43 | 0.42 | 0.026943 |
| | 2 | 0.099 | 0.059 | 0.118 | 0.00393333 | 0.39 | | |
| | 3 | 0.107 | 0.067 | 0.134 | 0.00446667 | 0.45 | | |
| 1 mM 4-HR | 1 | 0.091 | 0.051 | 0.102 | 0.0034 | 0.34 | 0.34 | 0.016777 |
| | 2 | 0.089 | 0.049 | 0.098 | 0.00326667 | 0.33 | | |
| | 3 | 0.094 | 0.054 | 0.108 | 0.0036 | 0.36 | | |

**ก.5 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%**

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ทางสถิติของการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO1

**Duncan**

| Name | N | Subset for alpha = 0.05 |
|---|---|---|
| | | 1 |
| 25 ppm 4-HR | 3 | 1.08233 |
| Control | 3 | 1.32033 |
| 0.05% SMS | 3 | 1.36267 |
| Sig. | | .166 |

Means for groups in homogenous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ทางสถิติของการแสดงออกของยีน *Lv*ProPO2

**Duncan**

| Name | N | Subset for alpha = 0.05 |
|---|---|---|
| | | 1 |
| 25 ppm 4-HR | 3 | .55700 |
| Control | 3 | .67233 |
| 0.05% SMS | 3 | .74800 |
| Sig. | | .222 |

Means for groups in homogenous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่ากิจกรรมของยีน (PO activity)

**Duncan**

| Conc | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0.1 mM SMS | 3 | .010667 | | | |
| 1 mM SMS | 3 | .016333 | | | |
| 1 mM 4-HR | 3 | | .051333 | | |
| 0.1 mM 4-HR | 3 | | .063333 | .063333 | |
| 0.01 mM SMS | 3 | | | .072667 | |
| 0.01 mM 4-HR | 3 | | | .075667 | |
| Control | 3 | | | | .088000 |
| Sig. | | .339 | .055 | .059 | 1.000 |

Means for groups in homogenous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

# ภาคผนวก ข

# โปรมแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้

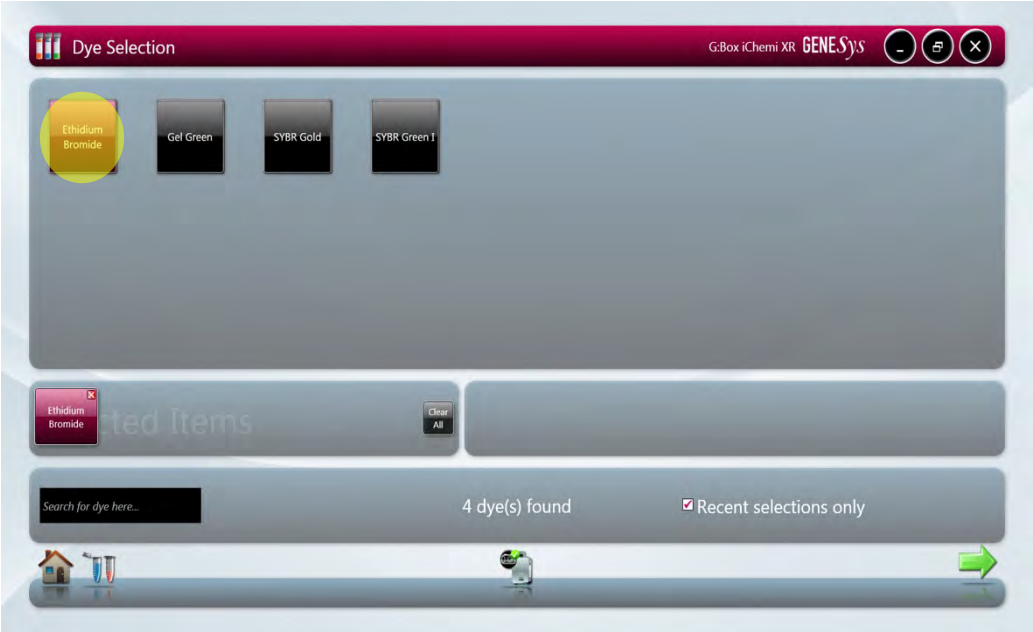
## ข.1 Gensys

Genesys เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับถ่ายภาพแถบแบนจากการรันเจล โดยจะเป็นโปรแกรมอัตโนมัติที่เชื่อมต่อกับเครื่อง Gel documentation มีขั้นตอนการใช้งานดังนี้

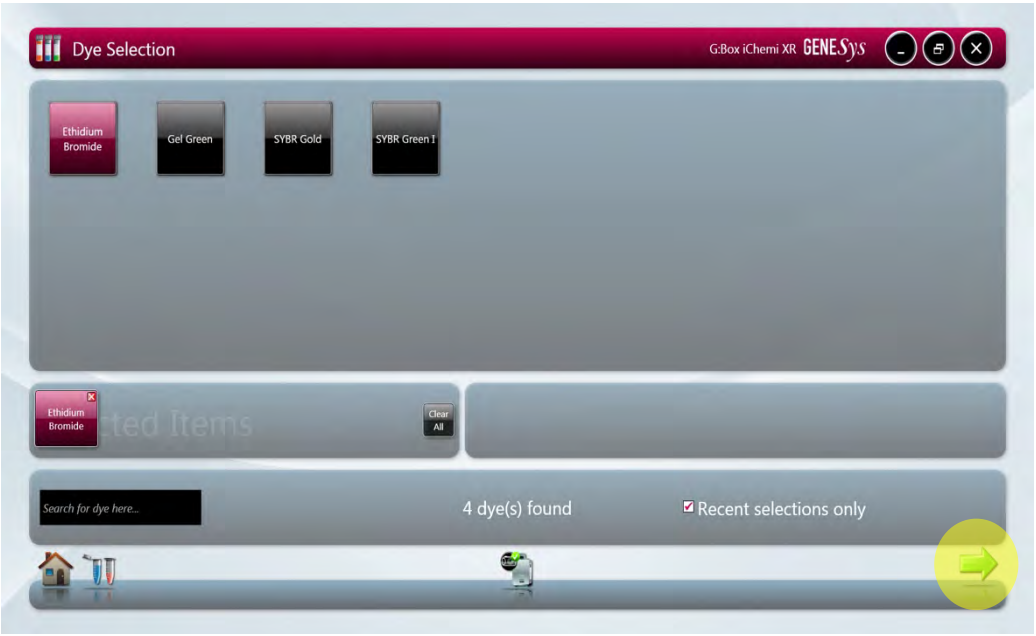
1) เปิดโปรแกรม จากนั้นเลือก Gels เพื่อถ่ายภาพจากการรันเจล

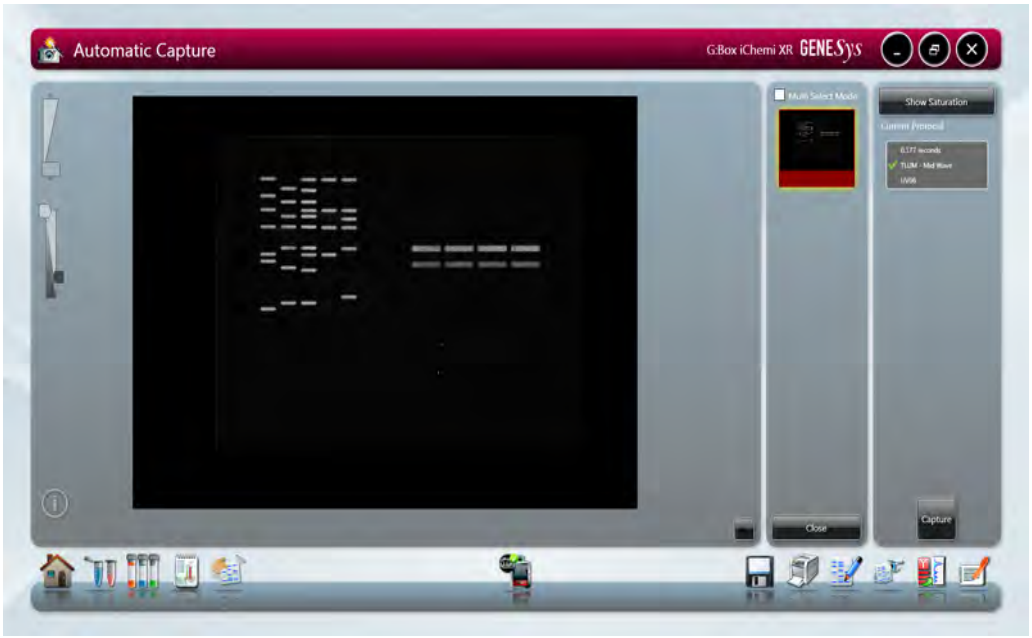
2) เลือกชนิดของเจลที่ใช้ โดยในการทดลองใช้ Agarose gel สำหรับวิเคราะห์ DNA

3) เลือกชนิดของสีที่ใช้ย้อมแผ่นเจล โดยในการทดลองใช้ Ethidium bromide

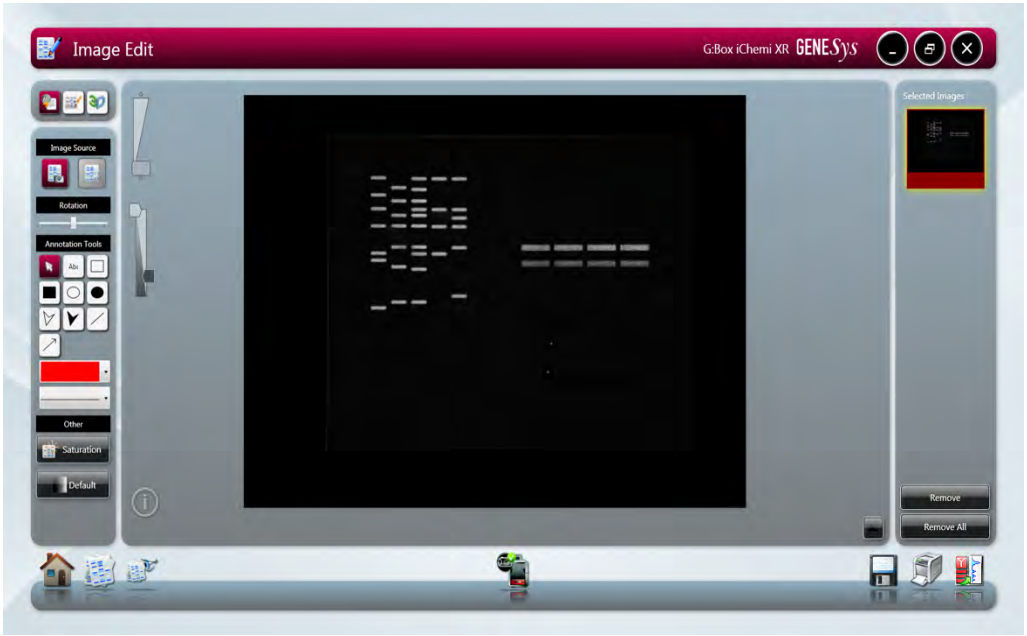



4) ใส่แผ่นเจลที่รันแล้วเข้าเครื่อง Gel documentation จากนั้นกดลูกศรสีเขียว โดยเครื่อง Gel documentation ที่เชื่อมอยู่กับโปรแกรมจะถ่ายภาพการรันเจลให้อัตโนมัติ

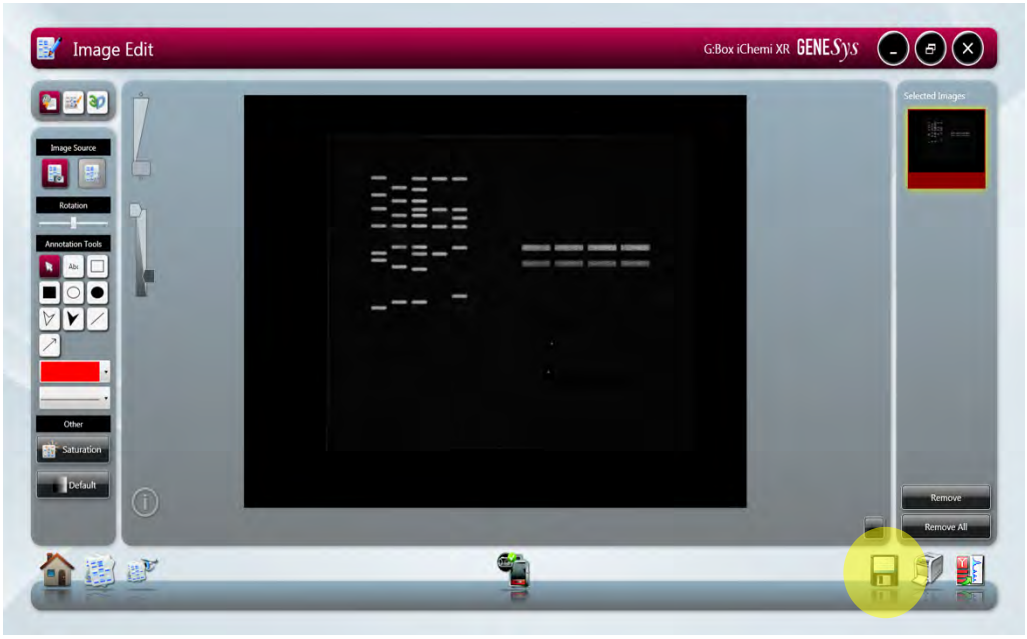





5) หลังจากได้ภาพถ่ายการรันเจลมาแล้ว สามารถปรับแต่งความสว่าง ความคมชัด ขนาดของรูปภาพ ได้จากแถบเมนูด้านซ้าย



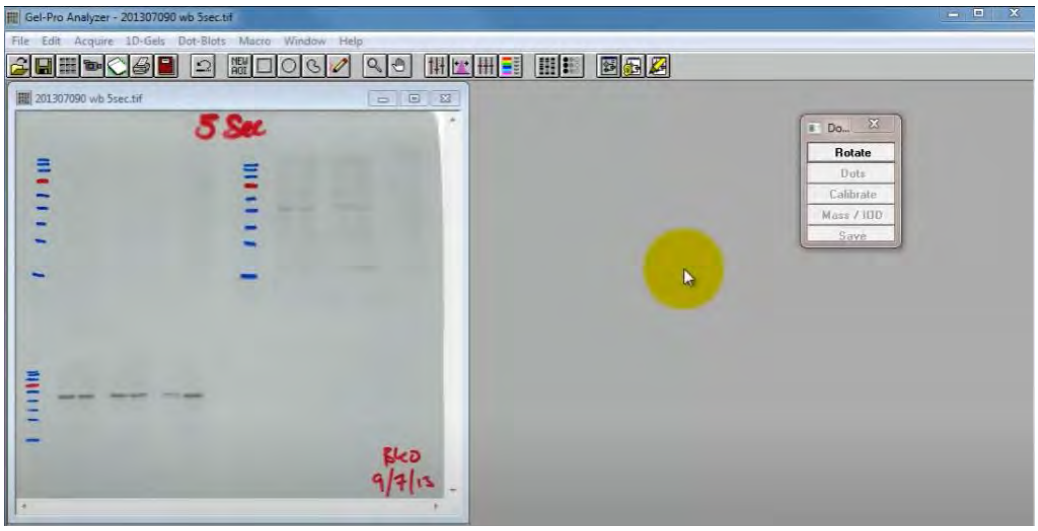
6) เมื่อปรับภาพเรียบร้อยแล้ว ให้บันทึกรูปภาพ โดยไฟล์รูปภาพที่ได้จะเป็นนามสกุล .sgd หรือ .tif



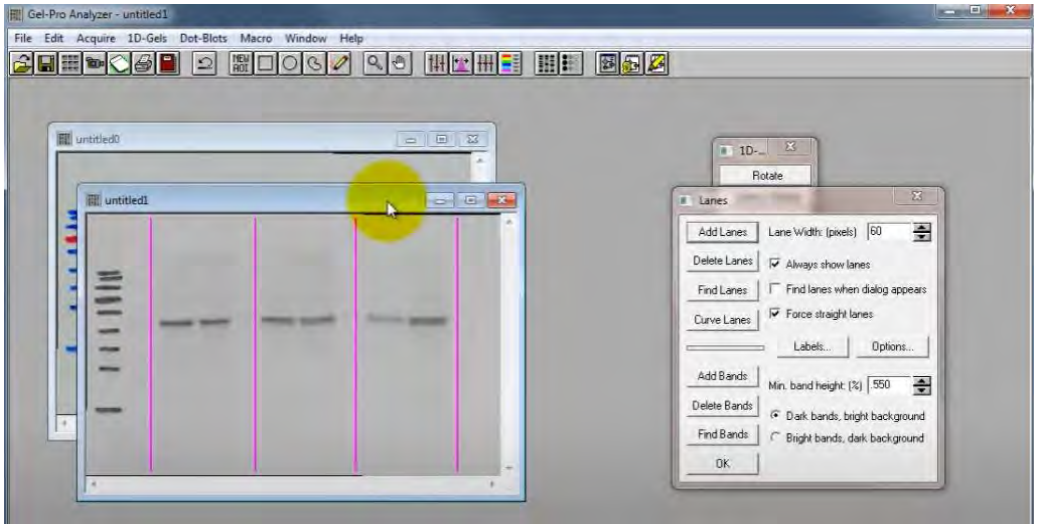

**ข.2 Gel Pro 3.1 Simple Analysis**

Gel Pro 3.1 Simple Analysis เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับวัดค่าการแสดงออกของยีน โดยการวัดความเข้มของแถบแบน มีขั้นตอนการใช้งานดังนี้

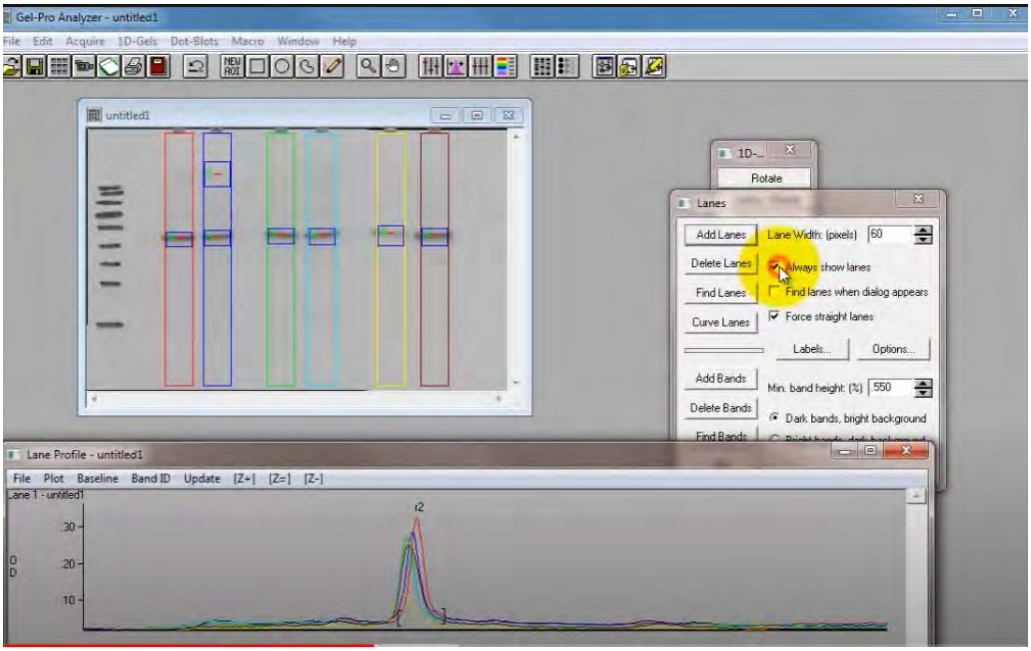
1) เปิดโปรแกรม จากนั้นนำภาพที่ได้จากการรันเจลเข้าโปรแกรม และตัดส่วนที่ต้องการจะวิเคราะห์



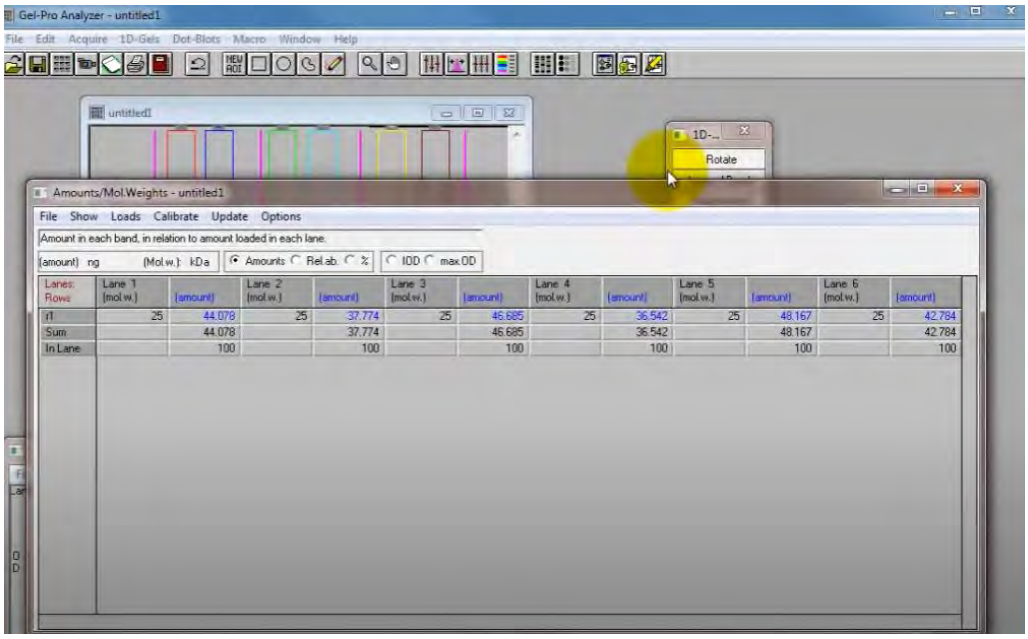
2) ไปที่เมนู 1-D-gel แล้วไปที่ Toolbar จากนั้นจะได้หน้าต่างแล้วจึงเลือก Lanes/Bands แล้วเลือก Extract intensity จะได้หน้าต่างที่แบ่ง Band ขึ้นมา




3) ไปที่เมนู Add lane จากนั้นเลือก Straight lane แล้วจึงไปเลือกเซลล์ที่ต้องการจะใช้ หลังจากเสร็จกระบวนการจะมีการแสดงกราฟขึ้นมา



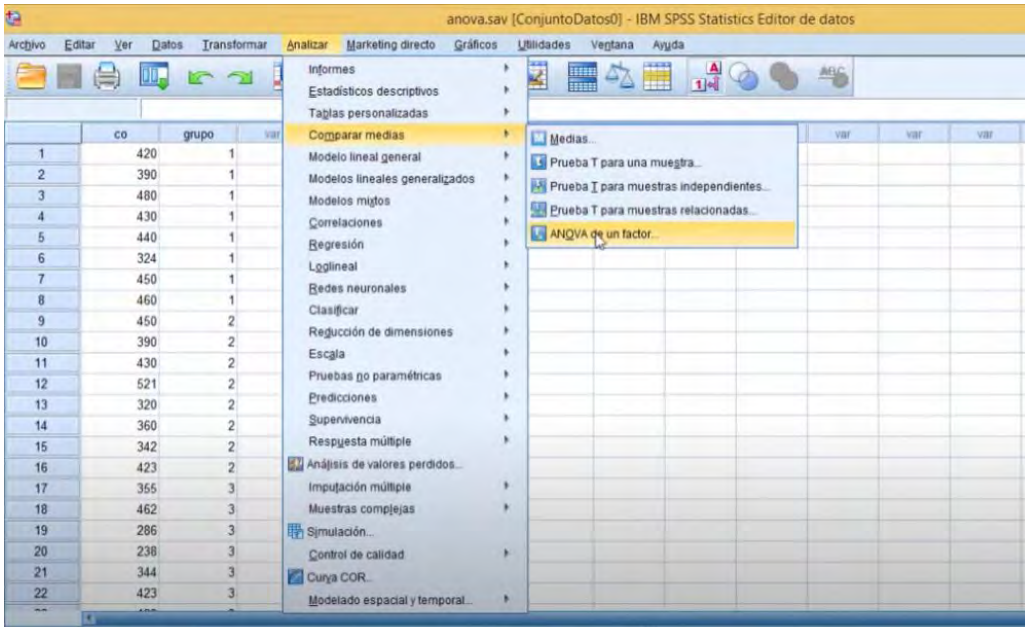
4) เลือกเมนู Mass/IOD เพื่อเก็บค่าจากตารางตามที่ต้องการ



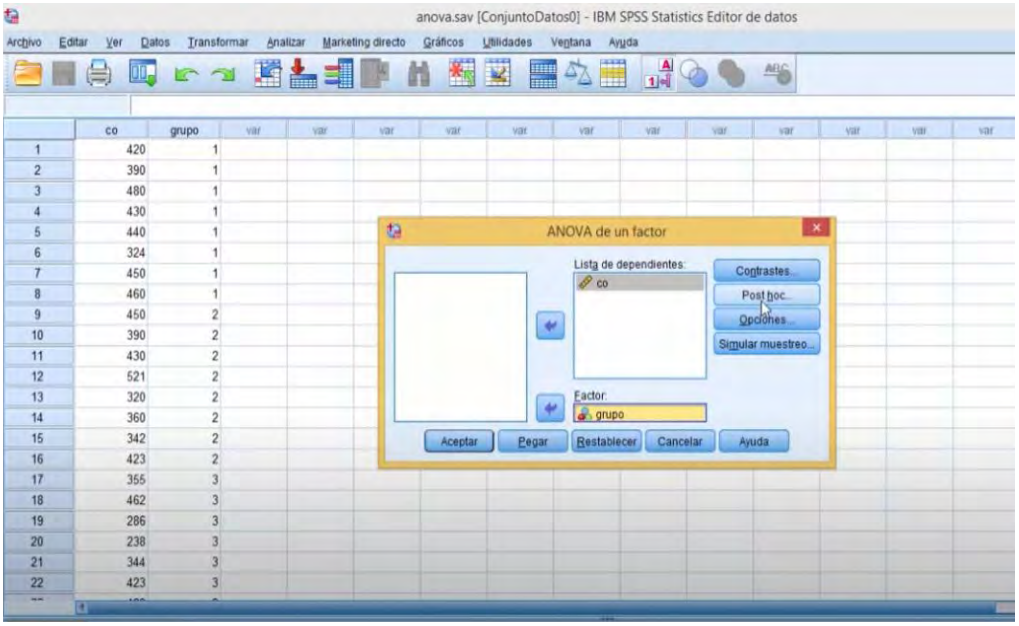

**ข.3 SPSS**

SPSS เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยในการทดลองใช้การวิเคราะห์ Analysis of variance (ANOVA) โดยใช้การคำนวณแบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีขั้นตอนการใช้งานดังนี้

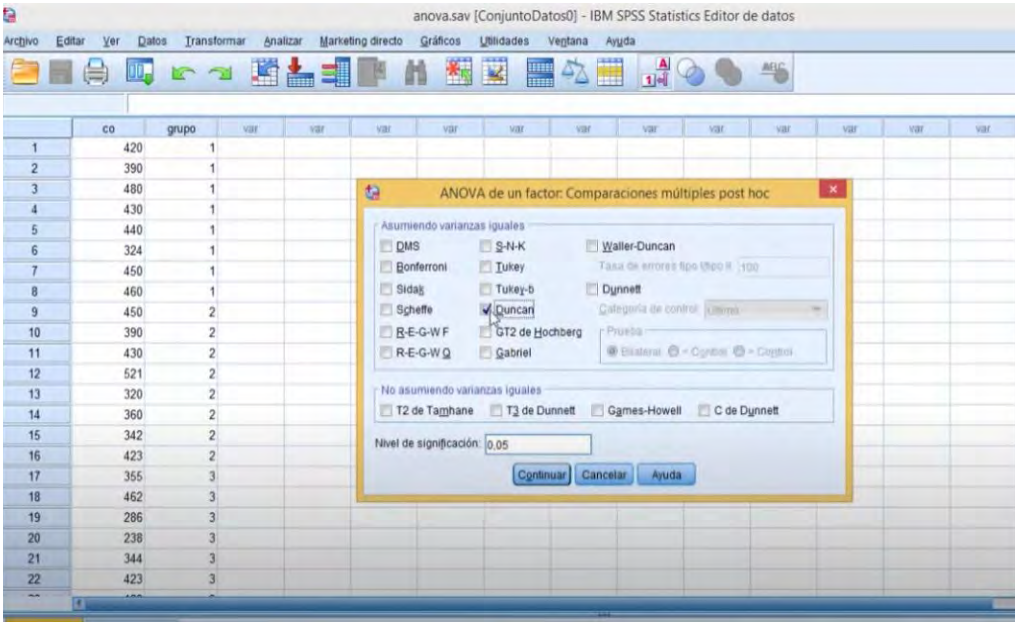
1) หลังจากที่ใส่ข้อมูลในตารางแล้ว ให้เข้าไปที่ Analysis จากนั้นไปที่ Compare media หรือ Compare Means และเลือก ANOVA factor หรือ One-Way ANOVA



2) ตั้งค่าตัวแปร โดย Dependent คือ ตัวแปรที่ต้องการศึกษา และ Factor คือ ตัวแปรจำแนกกลุ่ม จากนั้นให้เลือก Post Hoc.




3) เลือกวิธีวิเคราะห์ที่ต้องการ โดยในการทดลองเราใช้การวิเคราะห์แบบ Duncan จากนั้นให้ใส่ระดับนัยสำคัญที่เราต้องการวิเคราะห์ โดยในการทดลองเราวิเคราะห์ความแตกต่างที่ 95% และเลือก Continue



4) จากนั้นโปรแกรมจะแสดงตารางผลการวิเคราะห์ขึ้นมาให้

**Subconjuntos homogéneos**

co

Duncan[a]

| grupo | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | |
|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 |
| 5 | 8 | 284,25 | |
| 3 | 8 | 303,38 | |
| 4 | 8 | 359,38 | 359,38 |
| 2 | 8 | | 404,50 |
| 1 | 8 | | 424,25 |
| Sig. | | ,080 | ,130 |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 8,000.

# ภาคผนวก ค

## Material Safety Data Sheet (MSDS)

### ค.1 Sodium Metabisulfite (SMS)

**INEOS Calabrian**

**Safety Data Sheet**
**SODIUM METABISULFITE**

### Section 1 - Product and Company Identification

**Product Name:** Sodium Metabisulfite
**Chemical Formula:** $Na_2S_2O_4$
**CAS Number:** 007681-57-4
**Other Designations:** Sodium Pyrosulfite, Disodium Pyrosulfite, Pyrosulfurous Acid, Disodium Salt, Sodium Disulphite.
**General Use:** Food preservative, pharmaceutical manufacture, water dechlorination agent, lab reagent and other chemical process applications.
**Manufacturer:** INEOS Calabrian Corporation
5500 Hwy. 366
Port Neches, Texas77651

**Telephone:** 409-727-1471
**Fax:** 409-727-5803
**Emergency Contact:** CHEMTREC 800-424-9300

### Section 2 - Hazards Identification

**Emergency Overview**
**Target Organs:** Respiratory system, eyes, skin
**GHS Classification:** Acute Toxicity, Oral (Category 4)
Acute Toxicity, Dermal (Category 5)
Serious Eye Irritant (Category 2A)

**GHS Label Elements:** Signal Word – Warning

Pictogram

*Corrosive*

*Irritant*

**Hazard Statements:** H302 – Harmful if swallowed
H313 – May be harmful to skin
H319 – Causes serious eye irritation

**Precautionary Statements:** P281 – Wear protective equipment for hands, eyes, face and respiratory tract
P305, P351 and P338 – IF IN EYES: Rinse with water for several minutes. Remove contact lenses if present and continue rinsing.
**Other Hazards:** Contact with acids or water liberates toxic sulfur dioxide gas.

**HMIS Classification:**

| | |
|---|---|
| Health Hazard | 2 |
| Flammability | 0 |
| Physical | 0 |

INEOS Calabrian

**Safety Data Sheet**
**SODIUM METABISULFITE**

| | | |
|---|---|---|
| **NFPA Rating:** | Health Hazard | 2 |
| | Fire | 0 |
| | Reactivity | 0 |

| | | |
|---|---|---|
| **Potential Health Effects:** | Inhalation: | Irritant to respiratory tract |
| | Eye: | Irritant |
| | Skin: | Irritant |
| | Ingestion: | Harmful if swallowed |
| | Aggravated Medical Condition: | Capable of provoking bronchospasm in sulfite sensitive individuals with asthma. |

## Section 3 - Composition / Information on Ingredients

| Composition | CAS Number | % wt or vol |
|---|---|---|
| Sodium Metabisulfite | 007681-57-4 | 98 %(wt) |
| Sodium Sulfite | 007757-83-7 | 1 %(wt) |
| Sodium Sulfate | 007757-82-6 | 1 %(wt) |

## Section 4 - First Aid Measures

| Exposure Route | Symptom | Treatment |
|---|---|---|
| **Inhalation:** | Sore throat, shortness of breath coughing, and congestion. | Remove from exposure to fresh air. Seek medical attention in severe cases or if recovery is not rapid. |
| **Eye Contact:** | Irritation to eyes and mucous membranes. | Irrigate with water until no evidence of chemical remains. Obtain medical attention. |
| **Skin Contact:** | Irritation, itching, dermatitis | Wash with soap and drench with water. Remove contaminated clothing and wash before reuse. |
| **Ingestion:** | Irritation to mucous membranes. | Give large quantities of water or milk immediately. Obtain medical attention. |

**Seek appropriate medical attention *and provide this SDS to attending doctor***
**Note to physician:** **Exposure may aggravate acute or chronic asthma, emphysema and bronchitis.**

## Section 5 - Fire-Fighting Measures

| | |
|---|---|
| **Flammability:** | Not Flammable or combustible |
| **Extinguishing Media:** | Dry Powder is recommended |
| **Hazardous Products:** | May release hazardous gas with fire or water. |
| **Fire-Fighting Instructions:** | Do not release runoff from fire control methods to sewers or waterways. |

**Fire-Fighting Equipment:** Because fire may produce toxic thermal decomposition products, wear a self-contained breathing apparatus (SCBA) with a full face piece operated in pressure-demand or positive-pressure mode.

## Section 6 - Accidental Release Measures

**Spill / Leak Procedures:** Wear appropriate PPE - See Section 8.
**Small Spills / Leaks:** Spills can be neutralized with an alkaline material such as caustic soda. Leaks may be located by spraying the area with ammonium hydroxide solution which forms a white fume in the presence of sulfur dioxide.
**Large Spills / Leaks:** Large spills should be handled according to a predetermined plan.
**Containment:** For large spills, dike far ahead of contaminated runoff for later disposal.

## Section 7 - Handling and Storage

**Handling Precautions:** Avoid contact with product. Do not breathe dust or vapor.
**Storage Requirements:** Store in areas, away from heat and moisture and protect from *physical* damage. Segregate from acids and oxidizers.

## Section 8 - Exposure Controls / Personal Protection:

| Components | CAS Number | TWA | STEL | IDLH |
|---|---|---|---|---|
| Sodium Metabisulfite | 007681-57-4 | 5 mg/m$^3$ | * | * |
| Sodium Sulfite | 007757-83-7 | * | * | * |
| Sodium Sulfate | 007757-82-6 | * | * | * |

* None established.

**TWA** – Time Weighted Average based on 8 hour exposure days and a 40 hour week.
**STEL** – Short Time Exposure Limit
**IDLH** - Immediately Dangerous to Life or Health

**Ventilation:** Provide general or local exhaust ventilation systems to maintain airborne concentrations below OSHA limits (Sec. 2). Local exhaust ventilation is preferred because it prevents contaminant dispersion into the work area by controlling it at the source.

**Respiratory Protection:** Follow OSHA respirator regulations (29 CFR 1910.134) and if necessary, wear a MSHA/NIOSH-approved respirator. Select respirator based on its suitability to provide adequate worker protection for given working conditions, level of airborne contamination, and presence of sufficient oxygen. For emergency or non-routine operations (cleaning spills, reactor vessels, or storage tanks), wear a SCBA. ***Warning! Air-purifying respirators do not protect workers in oxygen-deficient atmospheres.***

| | |
|---|---|
| **Protective Clothing / Equipment:** | Wear protective gloves, boots, and clothing when necessary to prevent excessive skin contact. Wear protective eyeglasses or goggles, per OSHA eye and face protection regulations (29CFR 1910.133). |
| **Safety Stations:** | Make emergency eyewash stations, showers, and washing facilities available in the work area. |
| **Contaminated Equipment:** | Remove this material from personal protective equipment as needed |
| **Comments:** | Do not eat, drink, or smoke in work areas. Practice good personal hygiene after using this material, especially before food or beverage consumption |

## Section 9 - Physical and Chemical Properties

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Physical State:** | Solid crystal | **Water Solubility:** | 45 % @ 20 °C |
| **Appearance:** | White | **Other Solubility:** | NA |
| **Odor Threshold:** | pungent $SO_2$ odor | **Boiling Point:** | |
| **Vapor Pressure:** | | **Freezing Point:** | |
| **Vapor Density** (Air=1): | | **Melting Point:** | 150 °C / 302 °F |
| **Formula Weight:** | 190.11 | **Evaporation Rate:** | Normal. |
| **Density:** | NA | **pH:** | 4.0 – 4.5 [10 % Soln.] |
| **Specific Gravity** ($H_2O$=1): | 1.5 | **% Volatile:** | NA |

## Section 10 - Stability & Reactivity

| | |
|---|---|
| **Stability:** | Stable under normal conditions. |
| **Polymerization:** | Hazardous polymerization will not occur. |
| **Chemical Incompatibilities:** | In the presence of water, or acid, Sodium Metabisulfite (and solutions) may release toxic and hazardous fumes of sulfur oxides, including sulfur dioxide. Acute poisoning from sulfur dioxide is rare because the gas is easily detected. It is so irritating that contact cannot be tolerated. Symptoms include coughing, hoarseness, sneezing, tearing, and breathing difficulty. However, workers who cannot escape high accidental exposure may suffer severe pulmonary damage which can be fatal. Contact with powdered potassium, sodium metals, alkali, and oxidizing agents produce violent reactions. Reacts with water and steam to form corrosive sulfurous acid. Reacts with chlorates to form unstable chlorine dioxide. |
| **Conditions to Avoid:** | Avoid excessive heat, open flame, and moisture. |
| **Hazardous Decomposition:** | May release hazardous sulfur dioxide gas. |

## Section 11 - Toxicological Information

| | |
|---|---|
| **Eye Effects (rabbit):** | Not available. |
| **Skin Effects (rabbit):** | Non-corrosive. |
| **Acute Inhalation Effects (rat):** | Not available. |
| **Acute Oral Effects (rat):** | LD50 = 1131 mg/kg |
| **Acute Dermal Effects (rat):** | LD50 = > 2000 mg/kg |
| **Carcinogenicity:** | IARC, NTP, and OSHA do not list Sodium Metabisulfite as a carcinogen. |

| | |
|---|---|
| **Chronic Effects:** | Prolonged or repeated exposure may cause dermatitis, and sensitization reactions. Exposure to asthmatic, atopic and sulfite sensitive individuals can result in expiratory volume. Decomposition of sodium metabisulfite and solutions may release toxic and hazardous fumes of sulfur oxides, including sulfur dioxide, which may cause permanent pulmonary impairments from acute and chronic exposure. The Immediately Dangerous to Life or Health (IDLH) level for SO2 is 100 ppm. |
| **Skin:** | Contact with skin may result in irritation. Sulfite sensitive individuals may show signs of allergic contact dermatitis from repeated or prolonged skin exposure. |
| **Eyes:** | Exposure to dust may cause severe eye irritation with possible permanent damage. |
| **Inhalation:** | Inhalation of dust may result in respiratory tract irritation. May cause asthma-like symptoms in sensitive individuals. |
| **Ingestion:** | Swallowing can result in nausea, vomiting, diarrhea and abdominal pain. May also cause allergic reactions in sulfite sensitive individuals |

## Section 12 - Ecological Information

| | |
|---|---|
| **Ecotoxicity:** | Sodium Metabisulfite is a non hazardous solid commonly used as a waste water dechlorination agent. High concentrations will contribute to elevated chemical oxygen demand in aquatic environments. |
| 96 hour LC50 (fish): | 150-220 mg/L |
| 48 hour IC50 (algae): | 46 mg/L |
| 24 hour EC50 (water flea): | 89 mg/L |
| **Environmental Transport:** | Soluble in water. |
| **Environmental Degradation:** | Rapid biological decomposition. |
| **Soil Absorption/Mobility:** | Slight. |

## Section 13 - Disposal Considerations

| | |
|---|---|
| **Disposal:** | Waste determinations typically consider Sodium Metabisulfite contaminated materials to be non-hazardous. |
| **Disposal Regulatory Requirements:** | Follow applicable Federal, state and local regulations. |
| **Container Cleaning and Disposal:** | Follow applicable Federal, state and local regulations. |

## Section 14 - Transport Information

**DOT Transportation Data (49 CFR 172.101)**

| | |
|---|---|
| **Shipping Name:** | Sodium Metabisulfite, non-regulated material |
| **Shipping Symbols:** | NA |

| | |
|---|---|
| **Hazard Class:** | NA |
| **Subsidiary Hazard:** | NA |
| **ID No.:** | NA (No Placard Required) |
| **Packing Group:** | NA |
| **Label:** | GHS label |
| **Special Provisions:** | NA |

## Section 15 - Regulatory Information

| | |
|---|---|
| EPA Regulations: | |
| RCRA Hazardous Waste Classification (40 CFR 261): | Not listed. |
| CERCLA Hazardous Substance (40 CFR 302.4): | Not listed |
| CERCLA Reportable Quantity (RQ): | NA |
| SARA Title III: Section 302: | Not listed. |
| Section 313: | Not listed |
| FIFRA: | Not regulated. |
| TSCA: | Inventory listed chemical; PAIR Reportable<br>Not listed in Toxic Substances Chemical Index |
| **Other Regulations:** | |
| FDA (GRAS) | Regulated when used as a food preservative |
| California Prop 65 | Not Listed |
| IARC, NTP and OSHA Carcinogenicity: | Not Listed |
| WHMIS Classification (Canada): | D2B |

**Other Foreign Chemical Control Inventory Listing:**

Canada DSL, Australia AICS, Chinese IECSC, European Union EINEC, Japanese MITI, Korean KECL and Philippines PICCS

## Section 16 - Other Information

This product is NSF certified to NSF/ANSI Standard 60 and is subject to a maximum use limit (MUL) of 15 mg/L for potable water dechlorination applications.

| | |
|---|---|
| **Previous SDS issue date:** | January, 2015 |
| **Current SDS issue date:** | September, 2016 |
| **Reason for current revision:** | Company name change |

The information herein is believed to be reliable. However, no warranty, expressed or implied, is made as to its accuracy or completeness and none is made as to the fitness of this material for any purpose. The manufacturer shall not be liable for damages to person or property resulting from its use. Nothing herein shall be construed as a recommendation for use in violation of any patent.

ค.2 4-Hexylresorcinol (4-HR)

ThermoFisher SCIENTIFIC

# SAFETY DATA SHEET

**Creation Date** 16-Nov-2010 **Revision Date** 19-Jan-2018 **Revision Number** 3

## 1. Identification

**Product Name** **4-Hexylresorcinol**

**Cat No. :** **AC197920000; AC197920050; AC197920250; AC197921000**

**CAS-No** 136-77-6
**Synonyms** 4-Hexyl-1,3-benzenediol

**Recommended Use** Laboratory chemicals.
**Uses advised against** Food, drug, pesticide or biocidal product use.

**Details of the supplier of the safety data sheet**

**Company**
Fisher Scientific
One Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
Tel: (201) 796-7100

Acros Organics
One Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410

**Emergency Telephone Number**
For information **US** call: 001-800-ACROS-01 / **Europe** call: +32 14 57 52 11
Emergency Number **US:**001-201-796-7100 / **Europe:** +32 14 57 52 99
**CHEMTREC** Tel. No.**US:**001-800-424-9300 / **Europe:**001-703-527-3887

## 2. Hazard(s) identification

**Classification**
This chemical is considered hazardous by the 2012 OSHA Hazard Communication Standard (29 CFR 1910.1200)

| | |
|---|---|
| Acute oral toxicity | Category 4 |
| Skin Corrosion/Irritation | Category 2 |
| Serious Eye Damage/Eye Irritation | Category 2 |
| Specific target organ toxicity (single exposure) | Category 3 |
| Target Organs - Respiratory system. | |

**Label Elements**

**Signal Word**
Warning

**Hazard Statements**
Harmful if swallowed
Causes skin irritation
Causes serious eye irritation
May cause respiratory irritation

**Precautionary Statements**
**Prevention**
Wash face, hands and any exposed skin thoroughly after handling
Do not eat, drink or smoke when using this product
Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection
Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray
Use only outdoors or in a well-ventilated area
**Inhalation**
IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing
Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell
**Skin**
IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water
If skin irritation occurs: Get medical advice/attention
Take off contaminated clothing and wash before reuse
**Eyes**
IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing
If eye irritation persists: Get medical advice/attention
**Ingestion**
IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell
Rinse mouth
**Storage**
Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed
Store locked up
**Disposal**
Dispose of contents/container to an approved waste disposal plant
**Hazards not otherwise classified (HNOC)**
None identified

## 3. Composition/Information on Ingredients

| Component | CAS-No | Weight % |
|---|---|---|
| 4-Hexylresorcinol | 136-77-6 | >95 |

## 4. First-aid measures

**General Advice** — If symptoms persist, call a physician

**Eye Contact** — Rinse immediately with plenty of water, also under the eyelids, for at least 15 minutes. Get medical attention.

**Skin Contact** — Wash off immediately with plenty of water for at least 15 minutes. Get medical attention.

**Inhalation** — Remove to fresh air. Get medical attention. If not breathing, give artificial respiration.

**Ingestion** — Clean mouth with water and drink afterwards plenty of water. Get medical attention if symptoms occur.

**Most important symptoms and effects** — None reasonably foreseeable.

**Notes to Physician** — Treat symptomatically

## 5. Fire-fighting measures

**Suitable Extinguishing Media** — Water spray, carbon dioxide (CO2), dry chemical, alcohol-resistant foam.

**Unsuitable Extinguishing Media** — No information available

**Flash Point** — No information available
**Method -** — No information available

**Autoignition Temperature** — No information available
**Explosion Limits**
**Upper** — No data available
**Lower** — No data available
**Sensitivity to Mechanical Impact** — No information available
**Sensitivity to Static Discharge** — No information available

**Specific Hazards Arising from the Chemical**
Keep product and empty container away from heat and sources of ignition.

**Hazardous Combustion Products**
Thermal decomposition can lead to release of irritating gases and vapors. Carbon monoxide (CO). Carbon dioxide ($CO_2$).
**Protective Equipment and Precautions for Firefighters**
As in any fire, wear self-contained breathing apparatus pressure-demand, MSHA/NIOSH (approved or equivalent) and full protective gear.

**NFPA**

| Health | Flammability | Instability | Physical hazards |
|---|---|---|---|
| 2 | 1 | 0 | N/A |

## 6. Accidental release measures

**Personal Precautions** Use personal protective equipment as required. Ensure adequate ventilation. Avoid dust formation.

**Environmental Precautions** Should not be released into the environment. See Section 12 for additional Ecological Information.

**Methods for Containment and Clean Up** Sweep up and shovel into suitable containers for disposal. Keep in suitable, closed containers for disposal.

## 7. Handling and storage

**Handling** Wear personal protective equipment/face protection. Ensure adequate ventilation. Do not get in eyes, on skin, or on clothing. Avoid ingestion and inhalation. Avoid dust formation.

**Storage** Keep containers tightly closed in a dry, cool and well-ventilated place.

## 8. Exposure controls / personal protection

**Exposure Guidelines** This product does not contain any hazardous materials with occupational exposure limitsestablished by the region specific regulatory bodies.

**Engineering Measures** Ensure adequate ventilation, especially in confined areas. Ventilation systems. Ensure that eyewash stations and safety showers are close to the workstation location.

**Personal Protective Equipment**

**Eye/face Protection** Tight sealing safety goggles.

**Skin and body protection** Wear appropriate protective gloves and clothing to prevent skin exposure.

**Respiratory Protection** Wear a NIOSH/MSHA or European Standard EN 149 approved full-facepiece airline respirator in the positive pressure mode with emergency escape provisions.

**Hygiene Measures** Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

## 9. Physical and chemical properties

| | |
|---|---|
| **Physical State** | Solid |
| **Appearance** | White |
| **Odor** | Odorless |
| **Odor Threshold** | No information available |
| **pH** | No information available |
| **Melting Point/Range** | 65 - 70 °C / 149 - 158 °F |
| **Boiling Point/Range** | 333 - 335 °C / 631.4 - 635 °F |
| **Flash Point** | No information available |
| **Evaporation Rate** | Not applicable |
| **Flammability (solid,gas)** | No information available |
| **Flammability or explosive limits** | |
| **Upper** | No data available |
| **Lower** | No data available |
| **Vapor Pressure** | No information available |
| **Vapor Density** | Not applicable |
| **Specific Gravity** | No information available |
| **Solubility** | Partially soluble |
| **Partition coefficient; n-octanol/water** | No data available |
| **Autoignition Temperature** | No information available |
| **Decomposition Temperature** | > 333°C |
| **Viscosity** | Not applicable |
| **Molecular Formula** | C12 H18 O2 |
| **Molecular Weight** | 194.27 |

## 10. Stability and reactivity

**Reactive Hazard** None known, based on information available

**Stability** Stable under normal conditions.

**Conditions to Avoid** Incompatible products. Excess heat. Avoid dust formation.

**Incompatible Materials** Acid anhydrides, Acid chlorides, Oxidizing agent

**Hazardous Decomposition Products** Thermal decomposition can lead to release of irritating gases and vapors, Carbon monoxide (CO), Carbon dioxide ($CO_2$)

**Hazardous Polymerization** Hazardous polymerization does not occur.

**Hazardous Reactions** None under normal processing.

## 11. Toxicological information

**Acute Toxicity**

**Product Information**

**Component Information**

| Component | LD50 Oral | LD50 Dermal | LC50 Inhalation |
|---|---|---|---|
| 4-Hexylresorcinol | LD50 = 550 mg/kg ( Rat ) | Not listed | Not listed |

**Toxicologically Synergistic Products** No information available

**Delayed and immediate effects as well as chronic effects from short and long-term exposure**

**Irritation** Irritating to eyes, respiratory system and skin

**Sensitization** No information available

**Carcinogenicity** The table below indicates whether each agency has listed any ingredient as a carcinogen.

| Component | CAS-No | IARC | NTP | ACGIH | OSHA | Mexico |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 4-Hexylresorcinol | 136-77-6 | Not listed | Not listed | Not listed | Not listed | Not listed |

**Mutagenic Effects** No information available

**Reproductive Effects** No information available.

**Developmental Effects** No information available.

**Teratogenicity** No information available.

**STOT - single exposure** Respiratory system

**STOT - repeated exposure** None known

**Aspiration hazard** No information available

**Symptoms / effects,both acute and delayed** No information available

**Endocrine Disruptor Information** No information available

**Other Adverse Effects** The toxicological properties have not been fully investigated.

## 12. Ecological information

**Ecotoxicity**

Do not empty into drains.

**Persistence and Degradability** Insoluble in water Soluble in water Persistence is unlikely based on information available.

**Bioaccumulation/ Accumulation** No information available.

**Mobility** Is not likely mobile in the environment due its low water solubility. Will likely be mobile in the environment due to its water solubility.

## 13. Disposal considerations

**Waste Disposal Methods** Chemical waste generators must determine whether a discarded chemical is classified as a hazardous waste. Chemical waste generators must also consult local, regional, and national hazardous waste regulations to ensure complete and accurate classification.

## 14. Transport information

| | |
|---|---|
| **DOT** | Not regulated |
| **TDG** | Not regulated |
| **IATA** | Not regulated |
| **IMDG/IMO** | Not regulated |

## 15. Regulatory information

**United States of America Inventory**

| Component | CAS-No | TSCA | TSCA Inventory notification - Active/Inactive | TSCA - EPA Regulatory Flags |
|---|---|---|---|---|
| 4-Hexylresorcinol | 136-77-6 | X | ACTIVE | - |

**Legend:**
**TSCA** - Toxic Substances Control Act, (40 CFR Part 710)
X - Listed
'-' - Not Listed

**TSCA 12(b)** - Notices of Export: Not applicable

**International Inventories**
Canada (DSL/NDSL), Europe (EINECS/ELINCS/NLP), Philippines (PICCS), Japan (ENCS), Australia (AICS), China (IECSC), Korea (ECL)

| Component | CAS-No | DSL | NDSL | EINECS | PICCS | ENCS | AICS | IECSC | KECL |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4-Hexylresorcinol | 136-77-6 | X | - | 205-257-4 | X | - | X | X | KE-19902 |

**U.S. Federal Regulations**

| | |
|---|---|
| **SARA 313** | Not applicable |
| **SARA 311/312 Hazard Categories** | See section 2 for more information |
| **CWA (Clean Water Act)** | Not applicable |
| **Clean Air Act** | Not applicable |
| **OSHA** - Occupational Safety and Health Administration | Not applicable |
| **CERCLA** | Not applicable |
| **California Proposition 65** | This product does not contain any Proposition 65 chemicals. |
| **U.S. State Right-to-Know Regulations** | Not applicable |

**U.S. Department of Transportation**

| | |
|---|---|
| Reportable Quantity (RQ): | N |
| DOT Marine Pollutant | N |
| DOT Severe Marine Pollutant | N |

| | |
|---|---|
| **U.S. Department of Homeland Security** | This product does not contain any DHS chemicals. |

**Other International Regulations**

| | |
|---|---|
| **Mexico - Grade** | No information available |

## 16. Other information

| | |
|---|---|
| **Prepared By** | Regulatory Affairs<br>Thermo Fisher Scientific<br>Email: EMSDS.RA@thermofisher.com |
| **Creation Date** | 16-Nov-2010 |
| **Revision Date** | 19-Jan-2018 |
| **Print Date** | 19-Jan-2018 |
| **Revision Summary** | This document has been updated to comply with the US OSHA HazCom 2012 Standard replacing the current legislation under 29 CFR 1910.1200 to align with the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). |

**Disclaimer**
**The information provided in this Safety Data Sheet is correct to the best of our knowledge, information and belief at the date of its publication. The information given is designed only as a guidance for safe handling, use, processing, storage, transportation, disposal and release and is not to be considered a warranty or quality specification. The information relates only to the specific material designated and may not be valid for such material used in combination with any other materials or in any process, unless specified in the text**

# เอกสารอ้างอิง

AlphaMetrix Biotech. Gel imaging GeneSys. [Online]. 2020. Available from : http://www.alphametrix.de/page/index.php?category=geldoc&pageid=330 [2020, May 11]

Clark, J. GelPro 3.1 simple analysis. [Video file]. 2015. Available from : https://www.youtube.com/watch?v=kocnL9NesZ8&feature=youtu.be [2020, May 11]

Edgar, L.C.A. Anova & Duncan. [Video file]. 2015. Available from : https://www.youtube.com/watch?v=f15lys2zKSM&feature=youtu.be [2020, May 11]

INEOS Calabrian. Safety Data Sheet-Sodium Metabisulfite. [Online]. 2020. Available from : https://www.ineos.com/globalassets/ineos-group/businesses/ineos-enterprises/businesses/ineos-calabrian/resource-center/safety-data-sheets/meta_2016_sds_rev3.pdf [2020, May 13]

ThermoFisher SCIENTIFIC. Safety Data Sheet 4-Hexylresorcinol. [Online]. 2020. Available from :https://www.fishersci.com/store/msds?partNumber=AC197920250&productDescription=4-HEXYLRESORCINOL%2C+99%25+25GR&vendorId=VN00032119&countryCode=US&language=en [2020, May 13]

# ประวัติผู้วิจัย

| | |
|---|---|
| ชื่อ-สกุล | นางสาว ศรุตา พงศ์ทองมหาคุณ |
| ตำแหน่ง | หัวหน้าโครงการ |
| วุฒิการศึกษา | วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) |
| ภาควิชา | เทคโนโลยีทางอาหาร |
| คณะ | วิทยาศาสตร์ |
| มหาวิทยาลัย | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| ปีที่สำเร็จการศึกษา | 2563 |
| โทรศัพท์ | 086-372-8622 |
| Email | saruta_13716@hotmail.com |

# ประวัติผู้วิจัย (ต่อ)

ชื่อ-สกุล นางสาว ศุภกานต์ สังข์แก้ว

ตำแหน่ง ผู้วิจัยร่วม

วุฒิการศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่สำเร็จการศึกษา 2563

โทรศัพท์ 061-365-1546

Email min.supakarn@gmail.com