# บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

## วัตถุดิบ

เศษเหลือจากปลาทับทิม ที่เป็นส่วนของเครื่องในทั้งหมดจากร้านจำหน่ายปลาทับทิมสด ของบริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) บริเวณตลาดร่วมใจ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก โดยทำการเก็บตัวอย่างหลังแปรรูปทันที แช่ในน้ำแข็ง ขนส่งมาห้องปฏิบัติการ ภายในเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเศษเหลือปลาทับทิมมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด และล้างด้วยเอทานอลร้อยละ 95 โดยน้ำหนัก เพื่อกำจัดไขมัน สับเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดด้วยเครื่องบดเนื้อ (blender) คลุกเคล้าให้ผสมกันดี บรรจุใส่ถุงๆ ละ 200 กรัม เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้ก่อนนำมาทดลอง โดยก่อนทดลองต้องนำตัวอย่างมาละลายน้ำแข็งในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

## เอนไซม์

1. เอนไซม์ปาเปน (papain 3.36 U/mg: Sigma, Switzerland)
   1.1 ผลิตจาก ยางมะละกอ (*Carica papaya*)
   1.2 ลักษณะเป็นผง น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23,000 กิโลดาลตัน
   1.3 สภาวะที่เหมาะสม: ค่าความเป็นกรดด่าง 6.2 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
   1.4 ความสามารถในการย่อย (enzyme activity : unit) 1 ยูนิตเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์ N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE, Fluka No. 12880) 1 ไมโครโมล (μmol) ภายในเวลา 1 นาที ที่สภาวะที่เหมาะสม
2. เอนไซม์เปปซิน (pepsin 800-2,500 U/mg: Sigma, Switzerland)
   2.1 ผลิตจาก น้ำย่อยในกระเพาะอาหารของหมู
   2.2 ลักษณะเป็นผง น้ำหนักโมเลกุล 35 กิโลดาลตัน
   2.3 สภาวะที่เหมาะสม: ค่าความเป็นกรดด่าง 2.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
   2.4 ความสามารถในการย่อย (enzyme activity : unit) 1 ยูนิตเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์ฮีโมโกลบิน (hemoglobin ที่ $\triangle A_{280} = 0.001$) ภายในเวลา 1 นาที ที่สภาวะที่เหมาะสม

**เชื้อจุลินทรีย์**

1. *Bacillus subtilis* TISTR008 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

2. *Staphylococcus aureus* TISTR118 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

3. *Escherichia coli* ATCC25922 (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)

**สารเคมี**

1. เปปโตน (bacto peptone: Difco, USA)
2. เอทานอล (95% ethanol: Perser, Canada)
3. อัลบูมิน (albumin: Sigma, USA)
4. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: Lab-scan Ltd., Thailand)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: Lab-scan Ltd., Thailand)
6. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
   - 6.1 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (98% sulfuric acid: Fisher, UK)
   - 6.2 ซีลีเนียม (selenium reagent: Merck, Germany)
   - 6.3 กรดบอริก (boric acid: Rankem, India)
   - 6.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: Merck, Germany)
7. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไขมัน
   - 7.1 ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether: Lab-scan Ltd., Thailand)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
   - 8.1 1% peptone water
   - 8.2 Nutrient agar (NA)

**อุปกรณ์และเครื่องมือ**

1. เครื่องชั่งชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง (Model PE 503-S, Mettler Toledo, USA)
2. เครื่องชั่งชนิดละเอียด 3 ตำแหน่ง (Model AC 2105, Mettler Toledo, USA)
3. เครื่องวัดสี (Model DP9000, Hunter Lab, USA)
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Atiorion, The Schrafft Center, USA)
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (HACH DR/4000, Loveland, USA)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall, Biofuge Stratus, Germany)
7. ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Model 2020, Shaldon Manufacturing, USA)
8. ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ชนิดมีการเขย่าสาร (Model 205Q, N-Biotek, Korea)
9. ตู้อบความร้อนควบคุมอุณหภูมิได้ (Model UM-Oven 120 L, UMAC, USA)
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Polyscience: 8205, Pleasant Prairie, USA)
11. หม้อนึ่งความดัน (Model KT-30L, ALP, Japan)
12. โถดูดความชื้น (Duran, Germany)
13. เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน (GC: Model 6890 N, Agilent Tech., Germany/ MSD: Model 5973 inert, Agilent Tech., USA)
14. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (SJ-J17A, Sharp, Japan)
15. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (SCM-320SBD, SANDEN, Thailand)
16. เครื่องกลั่นระเหยสาร (B-490, Buchi, Switzerland)
17. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Model MAXI-DRY LYO, Heto-Holten, Denmark)
18. เครื่องปั่นตัวอย่าง (Model MX-795N, National, Malaysia)
19. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (B-323 S/N 1259061, Buchi, Switzerland)
20. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (B-810 S/N 0996182, Buchi, Switzerland)
21. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (S/N 60200010, Fisher, UK)
22. เครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (Model MA 40, Sartorius, Germany)
23. กระดาษกรองเบอร์ 4 (No.4: Whatman, English)
24. ถุงโพลีเอทิลีนแบบซิปล็อก
25. ถุงเมทัลไลท์
26. เครื่องปิดผนึก
27. ชุดเครื่องแก้

**ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย**

1. **ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเศษเหลือจากปลา**

1.1 ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000)

1.2 ปริมาณไขมัน โดยวิธี Soxhlet extraction (AOAC, 2000)

1.3 ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

1.4 ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

1.5 ค่าความเป็นกรดด่าง ด้วยเครื่อง pH meter

2. **ศึกษาชนิดเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซท**

ตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างขั้นต้น 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 จากนั้นปรับความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยปรับค่าความเป็นกรดด่าง เป็น 2.0 สำหรับเอนไซม์เปปซิน และค่าความเป็นกรดด่าง เป็น 6.5 สำหรับเอนไซม์ปาเปน นำไปไว้ในตู้บ่มชนิดที่มีการเขย่าสารความเร็วรอบ 140 รอบ/นาที ตามสภาวะการย่อยต่างๆ ที่ทำการแปรสภาวะ 3 ชนิดตัวแปร คือ

2.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย คือ 25, 31 และ 37 องศาเซลเซียส

2.2 เวลาที่ใช้ในการย่อย คือ 60, 90 และ 120 นาที

2.3 ความเข้มข้นของเอนไซม์ คือ ร้อยละ 0.25, 0.50 และ 0.75 โดยน้ำหนัก

จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในแต่ละสภาวะไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำไปทำการกรองด้วยกระดาษกรอง เพื่อแยกส่วนใส (โปรตีนไฮโดรไลเซท) แล้วนำไปวัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) คำนวณค่าระดับการย่อยสลายที่เกิดขึ้น (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ ($\alpha$-amino acid) โดยวิธีของ Hoyle & Merritt (1994) โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่น เติม trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ปล่อยให้เกิดการย่อยสลายด้วยตัวเอง แล้วคำนวณ %DH จาก

$$\%DH = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA soluble nitrogen)} * 100}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ (total nitrogen)}}$$

วางแผนการทดลองทางสถิติ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (complete randomize design) จัดหน่วยทดลองแบบ 3×3 Factorial ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับการย่อยสลาย ตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมประมวลผลทางสถิติ SPSS Statistics 17.0 ร่วมกับการใช้วิธี response surface model (RSM) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการย่อย ที่ให้ระดับการย่อยสลายเหมาะสมที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

**3. ศึกษาองค์ประกอบของผลิตผลที่ได้จากการย่อย**

วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ จากชนิดของเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาณเครื่องในปลาทับทิม ตัวอย่างละ 250 กรัม ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทเหลวแล้วนำไปกลั่นระเหย (evaporation) ที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส จนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 15 องศาบริกซ์ จากนั้นนำไปทำแห้งโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซทผงที่ผลิตได้ คือ

3.1 ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

3.2 ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

3.3 ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

3.4 ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

3.5 องค์ประกอบของกรดอะมิโน โดยใช้ GC-MS (AOAC, 2000)

3.6 ค่าสี โดยใช้ Hunter lab

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยองค์ประกอบของเปปโตนที่ผลิตได้ และเปปโตนทางการค้า (Bacto peptone: Difco, USA) โดยวิธี T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมประมวลผลทางสถิติ SPSS Statistics 17.0

**4. ทดสอบประสิทธิภาพผลผลิตที่ได้ในการใช้เป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์**

ทดสอบความสามารถในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้จากปลาทับทิมในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด จากข้อ 2 ทำการเปรียบเทียบกับเปปโตนทางการค้า โดยใช้ทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ

4.1 *Bacillus subtilis* TISTR008 (แกรมบวก, สร้างสปอร์)

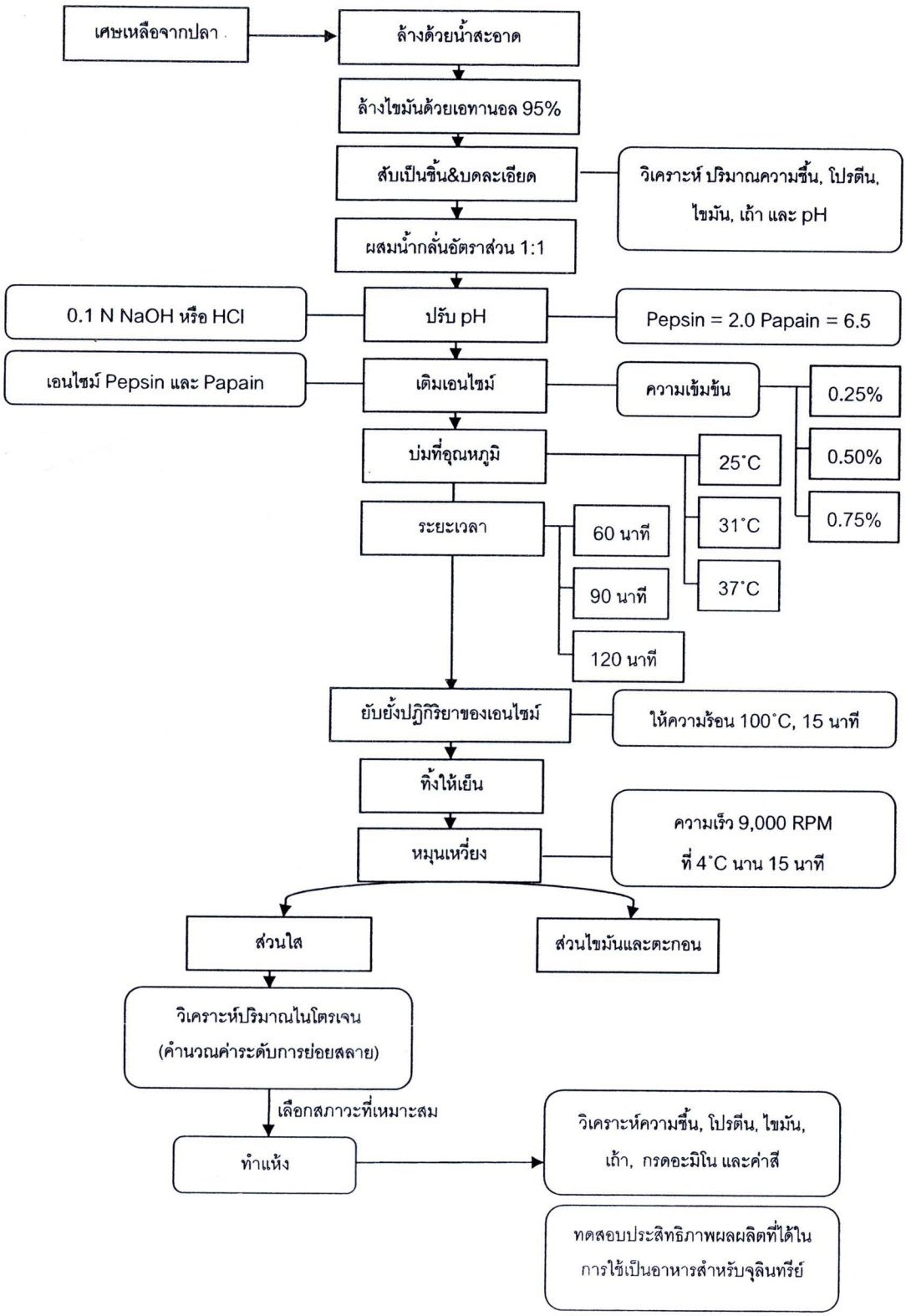
4.2 *Staphylococcus aureus* TISTR118 (แกรมบวก)

4.3 *Escherichia coli* ATCC25922 (แกรมลบ)

เตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ โดยเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้ชะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ และปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (A600) เท่ากับ 0.3 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $10^8$ cfu/ml) แล้วปิเปตสารละลายของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักของเปปโตน เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำไปอบอีกจนได้น้ำหนักแห้งคงที่ แล้วเปรียบเทียบปริมาณมวลชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone water ที่เตรียมจากเปปโตนที่ผลิตได้ และ เปปโตนทางการค้า (Bacto peptone: Difco, USA) โดยวิธี T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมประมวลผลทางสถิติ SPSS Statistics 17.0

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัยทั้งหมดของงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ดังภาพ 7




ภาพ 7 ขั้นตอนการดำเนินงาน