ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง)

ปริญญา

ผลิตภัณฑ์ประมง	ผลิตภัณฑ์ประมง
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การดูแลรักษาปูนิ่มหลังการเก็บเกี่ยว

Post-Harvest Handling of Soft-Shell Crabs

นามผู้วิจัย นางสาวสวามินี ธีระวุฒิ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ ....

(รองศาสตราจารย์นงนุช รักสกุลไทย, Ph.D.)

กรรมการ ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วันชัย วรวัฒนเมธีกุล, Ph.D.)

กรรมการ ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์บุญรัตน์ ประทุมชาติ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วันชัย วรวัฒนเมธีกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 26 **เดือน** มิถุนายน **พ.ศ.** 2550

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การดูแลรักษาปูนิ่มหลังการเก็บเกี่ยว

Post-Harvest Handling of Soft-Shell Crabs

โดย

นางสาวสวามินี ธีระวุฒิ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง)
พ.ศ. 2550

สวามินี ธีระวุฒิ 2550: การดูแลรักษาปูนิ่มหลังการเก็บเกี่ยว ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง) สาขาผลิตภัณฑ์ประมง ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์นงนุช รักสกุลไทย, Ph.D. 202 หน้า

ผลการศึกษาดัชนีความสดที่เหมาะสมของปูนิ่ม โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปูนิ่มที่บรรจุถุงพลาสติกโพลีเอธิลีนที่เก็บรักษาในกล่องสไตโรโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง พบว่า ดัชนีที่เหมาะสมได้แก่ ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยมีความสัมพันธ์กับคะแนนความชอบโดยรวมของปูนิ่มสด ($r^2 = 0.9343$) ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดที่อยู่ในเกณฑ์คือน้อยกว่า 13.53 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม และคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่เหมาะสมในการใช้เป็นเกณฑ์ในการแบ่งชั้นคุณภาพความสดของปูนิ่มสด ได้แก่ ลักษณะของกระดองและลำตัว และกลิ่นของปูนิ่มสด ส่วนคุณลักษณะที่เหมาะสมในการแบ่งชั้นคุณภาพความสดของปูนิ่มนึ่งได้แก่ ลักษณะเนื้อปู และกลิ่นของเนื้อปู การศึกษาวิธีการเก็บรักษาปูนิ่มที่เหมาะสมหลังการเก็บเกี่ยว สรุปได้ว่าปูนิ่มบรรจุในถุงพลาสติกที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บรักษานาน 5 วัน เมื่อเก็บรักษาในน้ำแข็ง และในน้ำแข็งผสมน้ำสามารถเก็บรักษาได้นาน 6 วันเท่ากัน แต่เมื่อคำนึงถึงลักษณะการบรรจุปูนิ่มที่ใช้อยู่ทั่วไปเกษตรกรจะบรรจุปูนิ่มในกล่องพลาสติกใสมีฝาปิด และใช้ลวดเย็บกระดาษเย็บให้ติดกัน จึงมีช่องว่างให้น้ำเข้าไปในกล่องได้ ดังนั้นสภาวะการเก็บรักษาปูนิ่มก่อนการแปรรูปที่เหมาะสมคือการเก็บในน้ำแข็ง

ผลการศึกษาคุณลักษณะบางประการของเอนไซม์โปรติเอส พบว่า กลุ่มเอนไซม์หลักที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว และเฮพาโทแพนเครียส เป็นกลุ่มของเมทาโลโปรติเอส ในขณะที่ทริพซินเป็นกลุ่มเอนไซม์หลักที่สกัดได้จากเนื้อส่วนก้าม โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท คือ 65 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดเบสระหว่าง 6-7 สารเคมีที่มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัวและเฮพาโทแพนเครียส มากที่สุดคือ EDTA ส่วน SBTI นั้นมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อส่วนก้ามได้สูงสุด สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนก้ามและเฮพาโทแพนเครียส คือ 40 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อส่วนลำตัว คือ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 และโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ให้ผลสูงสุดในการยับยั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว เนื้อส่วนก้ามและเฮพาโทแพนเครียส

ผลการศึกษาการใช้สารเคมีในการรักษาคุณภาพปูนิ่มสด พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะบรรจุถุงพลาสติกนำไปเก็บรักษาในน้ำแข็ง (น้ำแข็ง 3 กิโลกรัม/ปูนิ่ม 1 กิโลกรัม) จะสามารถเก็บรักษาปูนิ่มได้นาน 8 วัน ส่วนปูนิ่มที่ไม่แช่ในสารละลาย EDTA เก็บรักษาได้นาน 6 วัน

[signature]	[signature]	18 / ธ.ค. / 50
ลายมือชื่อนิสิต	ลายมือชื่อประธานกรรมการ	

Savaminee Teerawut 2007: Post-Harvest Handling of Soft-Shell Crabs. Doctor of Philosophy (Fishery Products), Major Field: Fishery Products, Department of Fishery Products.
Thesis Advisor: Associate Professor Nongnuch Raksakulthai, Ph.D. 202 pages.

The suitable freshness indicator for soft-shell crab was studied by monitoring the changes in soft-shell crabs packed in polyethylene bags which were kept in ice in a styrofoam box. The results showed that the most appropriate freshness indicator was TVB-N. The correlation (r^2) between TVB-N and the overall acceptability score was 0.9343. The acceptable value for TVB-N was 13.53 mg/100 g. The appropriate sensory attributes for grading freshness of whole soft-shell crabs were the appearance of shell and body and the odor of fresh soft-shell crab. For cooked soft-shell crab, the suitable attributes were the texture and odor. To study an appropriate method for post-harvest storage, soft-shell crabs were stored in polyethylene bags at 4°C, in ice and ice slurry. The results showed that the shelf life at 4°C was 5 days while in ice or ice slurry, it was 6 days. At present, most of the crabbers stored their soft-shell crab in clear plastic containers with lids sealed with staples which allowed water to flow inside; therefore, it is recommended to store soft-shell crab prior to futher processing in ice.

The partial characterizations of soft-shell crab protease were studied. It was found that the major group of protease from whole soft-shell crab, chunk and hepatopancrease were metallo-protease and protease from claw was trypsin. The optimum temperature of soft-shell crab proteases from whole soft-shell crab, chunk, claw and hepatopancrease using casein substrate was 65°C at pH 6-7. EDTA was the most effective inhibitor for the protease from whole soft-shell crab, chunk and hepatopancrease and SBTI was the most effective inhibitor for the protease from claw. For polyphenol oxidase (PPO), it was found that the optimum temperature of soft-shell crab PPO from whole soft-shell crab, claw and hepatopancrease were 40°C and the optimum temperature of soft-shell crab PPO from chunk was 45°C. The optimum pH of soft-shell crab PPO from whole soft-shell crab, chunk, claw and hepatopancrease were 8. Sodium metabisulphite was the most effective inhibitor for soft-shell crab PPO from whole soft-shell crab, chunk, claw and hepatopancrease.

To prolong shelf-life of soft-shell crab using a chemical additive, it was found that whole soft-shell crabs dipped in 40 mM EDTA for 10 minutes before packing in plastic bags could be kept in ice (3 Kg ice:1 Kg crab) for 8 days, while control sample could be kept for only 6 days.

S. Teerawut — Student's signature

Nongnuch Raksakulthai — Thesis Advisor's signature

15 / 06 / 07

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. นงนุช รักสกุลไทย ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผศ. ดร. วันชัย วรวัฒนเมธีกุล และ ผศ. ดร. บุญรัตน์ ประทุมชาติ กรรมการที่ปรึกษา ดร. จินตนา สและน้อย ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและแนวทางการแก้ปัญหา ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมงทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนความคิดอันเป็นระบบให้แก่ข้าพเจ้า กำลังใจจากคณาจารย์ทุกท่านที่ได้มอบให้แก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและวิจัยตลอดหลักสูตรการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมงทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณความมีน้ำใจ ความช่วย เหลือในทุก ๆ ด้านและกำลังใจของ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ นิสิตปริญญาโท และปริญญาเอก ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง

ท้ายที่สุด ขอระลึกถึงพระคุณของคุณแม่สุจรรยา คุณพ่อสมนึก ธีระวุฒิ และทุกคนในครอบครัวที่มอบความรัก ความห่วงใย กำลังใจ ให้การสนับสนุนในการศึกษาและเสียสละเพื่อข้าพเจ้าตลอดมา

สวามินี ธีระวุฒิ

มิถุนายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	35
อุปกรณ์	35
วิธีการ	38
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	46
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	131
สรุปผลการทดลอง	131
ข้อเสนอแนะ	133
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	134
ภาคผนวก	154
ภาคผนวก ก แบบสอบถาม	155
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และทางเคมี	158
ภาคผนวก ค ภาพผลการทดลองและตารางแสดงผลความแปรปรวนทางสถิติ	171
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	202

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
1	ขนาดความยาวของกระดองและน้ำหนักโดยเฉลี่ยต่อตัวของปูนิ่มสด	13
2	หลักเกณฑ์การให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่มสด	52
3	หลักเกณฑ์การให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่มนึ่ง	54

ตารางผนวกที่

ตารางผนวกที่		หน้า
ค1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่า K ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ค่าความเป็นกรดเบส ปริมาณความชื้น และปริมาณเกลือของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	178
ค2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	179
ค3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	180
ค4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	182
ค5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ความเป็นกรดเบส และการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	184
ค6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าสีปูนิ่มสดและสีปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	185
ค7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าเนื้อสัมผัสเฉลี่ยของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน	186
ค8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน	188

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน 189
ค10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน 191
ค11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ความเป็นกรดเบส และการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 193
ค12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าสีปูนิ่มสดและสีปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 194
ค13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าเนื้อสัมผัสเฉลี่ยของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 195
ค14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 197
ค15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 198
ค16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 200

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกของปูทะเล	4
2	ความแตกต่างระหว่างปูเพศผู้และเพศเมียโดยอาศัยลักษณะที่แตกต่างบริเวณส่วนท้อง	5
3	วงจรชีวิตและวิวัฒนาการของปูทะเล	7
4	สูตรโครงสร้างทางเคมีและกระบวนการสังเคราะห์ฮีสตามีน	16
5	การเกิด melanin จาก tyrosine	31
6	กลไกของสารเคมีกลุ่มซัลไฟต์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส	33
7	กลไกของกรดแอสคอร์บิกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส	33
8	การเปลี่ยนแปลงค่า K ของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา	48
9	การเปลี่ยนแปลงค่า TVB-N ของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา	48
10	การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา	49
11	การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา	49
12	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา	50
13	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา	51
14	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเกลือของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา	51
15	การเปลี่ยนแปลงปริมาณการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา	52
16	การเปลี่ยนแปลงค่า K ของปูนิ่มที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	56
17	การเปลี่ยนแปลงค่า TVB-N ของปูนิ่มที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	56
18	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่มที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	57
19	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของปูนิ่มที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	58
20	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเกลือของปูนิ่มที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	58
21	การเปลี่ยนแปลงการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

22 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกระดองและลำตัวของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 60
23 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 60
24 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพเนื้อของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 61
25 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 61
26 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 63
27 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีกระดองของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 63
28 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีเปลือกด้านท้องของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 64
29 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างต่างกัน 65
30 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 65
31 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 66
32 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 68
33 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีเนื้อของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 68
34 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 69

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

35 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรสชาติของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 69
36 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 70
37 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน 70
38 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม 72
39 ผลของค่าความเป็นกรดเบสต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม 74
40 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม 76
41 ความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม 77
42 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม 79
43 ผลของความเป็นกรดเบสต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม 80
44 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม 81
45 การเปลี่ยนแปลงค่า TVB-N ของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน 85
46 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน 85
47 การเปลี่ยนแปลงค่าการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน 86
48 การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* a* b* ของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน 90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
49	การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* a* b* ของปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	91
50	การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกระดองและลำตัวของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	92
51	การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	93
52	การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	93
53	การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	94
54	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	95
55	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีกระดองของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	96
56	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีเปลือกด้านท้องของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	97
57	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	98
58	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	99
59	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	100
60	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	101

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
61	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	102
62	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรสชาติของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	102
63	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	103
64	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	104
65	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน	105
66	การเปลี่ยนแปลงค่า TVB-N ของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	109
67	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	109
68	การเปลี่ยนแปลงค่าการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	110
69	การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* a* b* ของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	113
70	การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* a* b* ของปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	114
71	การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกระดองและลำตัวของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	115
72	การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	116

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
73	การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	116
74	การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	117
75	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	119
76	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีกระดองของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	119
77	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	120
78	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	121
79	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีเปลือกด้านท้องของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	122
80	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	122
81	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	123
82	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	124
83	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรสชาติเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	125
84	การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	126

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

85 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 127

86 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 128

ภาพผนวกที่

ค1 ค่า Hardness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน 172

ค2 ค่า Adhesiveness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน 172

ค3 ค่า Springiness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTAความเข้มข้นต่างกัน 173

ค4 ค่า Cohesiveness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน 173

ค5 ค่า Chewiness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน 174

ค6 ค่า Gumminess ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน 174

ค7 ค่า Hardness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 175

ค8 ค่า Adhesiveness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 175

ค9 ค่า Springiness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 176

ค10 ค่า Cohesiveness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน 176

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ค11	ค่า Chewiness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	177
ค12	ค่า Gumminess ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน	177

การดูแลรักษาปูนิ่มหลังการเก็บเกี่ยว

Post-Harvest Handling of Soft-Shell Crabs

คำนำ

ปูทะเล (mud crab, *Scylla* sp.) เป็นสัตว์ทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีผู้นิยมบริโภคจำนวนมากและยังเป็นสินค้าส่งออกที่มีมูลค่านับพันล้านบาท อย่างไรก็ดีผลผลิตที่ได้จากการจับจากธรรมชาติจะเป็นปูที่มีกระดองแข็ง ซึ่งการบริโภคปูกระดองแข็งนั้นมีข้อจำกัดในด้านกระบวนการแปรรูปรวมถึงการนำมาปรุงอาหาร ผู้บริโภคจึงนิยมบริโภคปูที่มีกระดองนิ่ม หรือที่เรียกว่า ปูนิ่ม (soft- shell crab) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสหรัฐอเมริกา เนื่องจากบริโภคได้ง่าย สามารถนำมาปรุงอาหารได้สะดวกและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลาย นอกจากนี้ยังมีประเทศจีน ฮ่องกง ไต้หวัน ญี่ปุ่น และประเทศในทวีปยุโรป ที่นิยมบริโภคผลิตภัณฑ์ปูนิ่ม จึงส่งผลให้ปูนิ่มมีแนวโน้มด้านการตลาดที่สดใส

ปูนิ่มในประเทศไทยที่วางขายปัจจุบันเป็นปูทะเลทั้งสิ้น โดยส่วนใหญ่จะเป็นปูดำและปูขาว บางครั้งอาจมีปูเขียว หรือ ปูม่วงปะปนมาบ้าง เทคโนโลยีการเลี้ยงปูนิ่มได้ผ่านขั้นตอนการทดสอบความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ระดับหนึ่งแล้ว แต่ยังคงพบปัญหาที่ต้องปรับปรุงอีก เช่น การสูญเสียความแน่นเนื้อหลังการลอกคราบ รวมถึงปัญหาการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ (enzymatic browning reaction) อีกด้วย ดังนั้นการศึกษา การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปูนิ่มหลังการลอกคราบ และการศึกษาคุณลักษณะบางประการของเอนไซม์ที่มีผลต่อการสูญความแน่นเนื้อและการเกิดสีน้ำตาลในปูนิ่ม จะทำให้สามารถพัฒนาเทคนิคการจัดการดูแลรักษาปูนิ่มเพื่อชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพภายหลังการลอกคราบ จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิตเชิงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวปูนิ่มให้ดียิ่งขึ้น เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการส่งเสริมอุตสาหกรรมการเลี้ยงปูนิ่มต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาดัชนีวัดความสดของปูนิ่ม

2. เพื่อศึกษาวิธีการเก็บรักษาปูนิ่มก่อนการแปรรูป

3. เพื่อศึกษาคุณลักษณะบางประการของเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

4. เพื่อศึกษาการใช้สารเคมีในการยับยั้งการสูญเสียความแน่นเนื้อและการเกิดสีน้ำตาลในปูนิ่ม

การตรวจเอกสาร

ปูทะเลและปูนิ่มจากปูทะเล

1. ลักษณะทางอนุกรมวิธานของปูทะเล

Barnes (1968) ได้จำแนกปูทะเลทางอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Phylum Arthropoda
Superclass Crustacea
Class Malacostraca
Subclass Eumalacostraca
Superorder Eucarida
Order Decapoda
Suborder Reptantia
Section Brachyura
Family Portunidae
Genus *Scylla*
Species *Scylla serrata* (Forskäl, 1775)

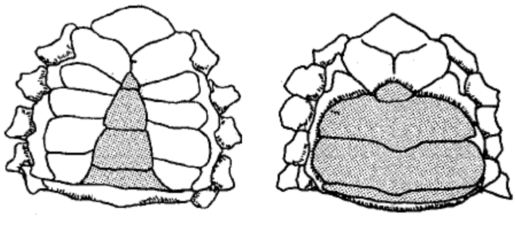
ปูทะเลมีชื่อสามัญที่แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น โดยในน่านน้ำไทย พบว่ามีอย่างน้อยสามชนิดคือ ปูดำ ปูแดง (*Scylla serrata* Forskäl) ปูขาว ปูทองหลาง (*Scylla oceanica* Dana) และปูเขียว ปูทองโหลง ปูลาย (*Scylla tranquebarica* Fabricius) ปูทะเลมีถิ่นที่อยู่อาศัยแตกต่างกันไปตามชนิดและขนาด เช่น ปูดำชอบอาศัยอยู่ในรู ส่วนปูขาวและปูเขียวชอบหมกตัวอยู่ในทราย หรือในโคลนตามทะเล ชายฝั่งที่มีหญ้าทะเล ป่าแสม ป่าโกงกางและในแหล่งน้ำกร่อย รวมถึง ตามป่าชายเลนและปากแม่น้ำที่มีน้ำทะเลท่วมถึง โดยอ่าวไทยฝั่งตะวันออกได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด ชลบุรี ส่วนอ่าวไทยตอนในได้แก่ สมุทรปราการ สมุทรสงคราม และอ่าวไทยฝั่งตะวันตก ที่จังหวัดชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สงขลา ตรัง ส่วนฝั่งอันดามัน ได้แก่ จังหวัดระนอง กระบี่ และสตูล (ชลธี, 2539) (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, ม.ป.ป)

2. ลักษณะทั่วไปของปูทะเล

2.1 ลักษณะภายนอก

ปูทะเลมีร่างกายแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head) อก (thorax) และท้อง (abdomen) ส่วนหัวและส่วนอกจะติดกันรวมเรียกว่า cephalothorax มีกระดอง (carapace) หุ้มอยู่ตอนบน กระดองมีรูปร่างรี เป็นรูปไข่ ด้านข้างของกระดองเป็นรอยหยัก คล้ายฟันเลื่อย เป็นหนามแหลมและเบ้าตามีหนามอีก 4 หนาม ปูทะเลมีตาด้านหน้า 1 คู่ ซึ่งเป็นตาประกอบ ก้านตายาว สามารถชูและพับอยู่ในเบ้าตาได้ ปูทะเลมีขา 5 คู่ ขาคู่แรกอยู่หน้าสุดมีขนาดใหญ่เรียกว่า “ ก้าม ” (chela) ปลายสุดของขาเดินคู่ที่ 2-4 มีลักษณะปลายแหลม เรียกว่า ขาเดิน (walking leg) ส่วนขาที่ 5 เรียกว่า ขาพาย (paddle) มีหน้าที่ช่วยในการว่ายน้ำ เมื่อโตเต็มวัย ปูเพศผู้จะมีก้ามใหญ่ ตับปิ้งเรียวแคบ ตัวเมียจะมีก้ามเล็ก ตับปิ้งกว้างเป็นรูปครึ่งวงกลมจนเต็มหน้าอก ปลายมนกลม ใช้สำหรับการอุ้มไข่หลังการผสมพันธุ์ (มาโนช และบุญส่ง, 2512) ลักษณะภายนอกของปูทะเลและลักษณะความแตกต่างของปูเพศผู้และเพศเมีย แสดงดังภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปูทะเล
ที่มา: CRC Reef Research Centre (2005)



ภาพที่ 2 ความแตกต่างระหว่างปูเพศผู้และเพศเมียโดยอาศัยลักษณะที่แตกต่างบริเวณส่วนท้อง
ที่มา: Department of Primary Industries of Queensland (n.d.)

2.2 ลักษณะภายในของปูทะเล

เมื่อเปิดกระดองปูทะเลจะพบว่าภายในกระดองมีเยื่อบาง ๆ กรุอยู่ทั้งด้านซ้ายและด้านขวาทำหน้าที่เก็บความชื้น ในเพศเมียเมื่อสืบพันธุ์บริเวณดังกล่าวใช้สำหรับเก็บไข่ (egg mass) ที่สร้างขึ้นที่ลำตัว ภายในมีเหงือกอยู่สองข้างลำตัวมีลักษณะคล้ายขนนก ทำหน้าที่ช่วยในการหายใจ นอกจากนี้จะพบระบบต่าง ๆ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ระบบหมุนเวียนโลหิต ระบบขับถ่าย และระบบสืบพันธุ์ ในเลือดปูมีสารฮีโมไซยานิน ซึ่งมีทองแดงเป็นองค์ประกอบ เมื่อสัมผัสออกซิเจนจะทำให้เลือดมีสีน้ำเงินอ่อน ๆ (Green, 1961)

3. การพัฒนาของรังไข่

ภายหลังจากที่ปูเพศเมียได้รับน้ำเชื้อจากตัวผู้แล้ว รังไข่จะพัฒนาเป็นไข่สมบูรณ์ภายใน 40-60 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความเค็มของน้ำ ความสมบูรณ์ของอาหาร และคุณภาพของน้ำ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ม.ป.ป.) กล่าวถึง การพัฒนาของรังไข่ว่าสามารถแบ่งได้ 4 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 (under developed stage) รังไข่มีลักษณะเป็นเส้นยาวแบน 2 เส้น แทรกอยู่ในช่องว่างภายในลำตัวตามขอบกระดองด้านหน้า ระยะนี้รังไข่มีขนาด 1/6 ของช่องว่างภายในลำตัว มีลักษณะสีขาว โปร่งใส

ระยะที่ 2 (early developed stage) รังไข่ขยายใหญ่ขึ้นประมาณร้อยละ 10-20 ของช่องว่างภายในลำตัว มีรอยหยักสีครีมหรือสีเหลืองอ่อน หรือสีชมพู

ระยะที่ 3 (nearly ripe stage) รังไข่ขยายตัวขดไปตามช่องว่างภายในลำตัว คลุมพื้นที่ประมาณร้อยละ 20-75 ของช่องว่างภายในลำตัว มีสีเหลืองหรือสีชมพู

ระยะที่ 4 (ripe stage) รังไข่สมบูรณ์เต็มที่ ไข่แน่นเต็มช่องว่างภายในลำตัว ผิวมันวาว มองจากด้านบนรูปร่างคล้ายสมอเรือ ไข่แยกเป็นเม็ด มีสีส้มเหลืองถึงส้มแดง

4. การวางไข่

การวางไข่ของปูทะเลในประเทศไทยนั้นแบ่งได้เป็น ฝั่งทะเลตะวันออกจะวางไข่ในช่วงกันยายนถึงมกราคม ส่วนภาคใต้ฝั่งตะวันออกจะวางไข่ 2 ช่วงคือ มกราคมถึงกุมภาพันธ์ และสิงหาคมถึงธันวาคม และฝั่งทะเลอันดามันจะวางไข่ช่วงกันยายนถึงธันวาคม ส่วนการวางไข่ของปูขาวทางภาคใต้ฝั่งตะวันออกจะวางไข่ 2 ช่วงเช่นกันคือ สิงหาคม และธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ ในขณะที่ปูเขียวทางฝั่งทะเลตะวันออกจะวางไข่ช่วงมกราคมถึงมีนาคม

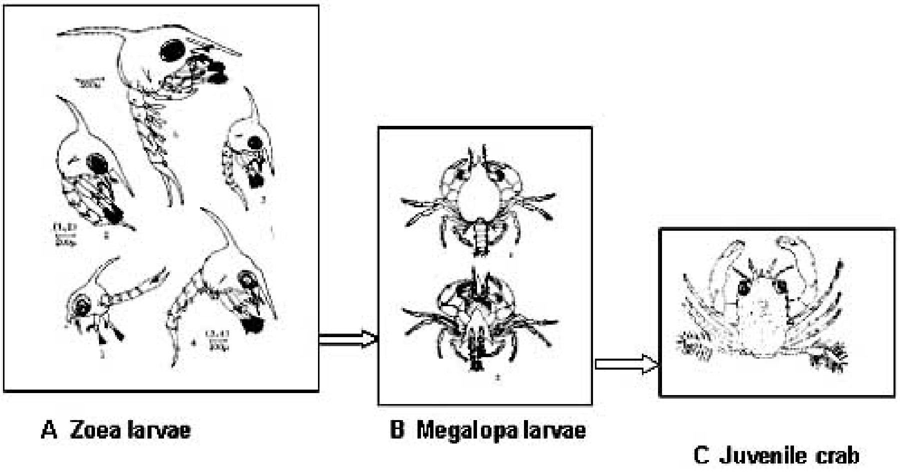
เมื่อถึงฤดูวางไข่ปูจะอพยพไปวางไข่ โดยแม่ปูทะเลจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 20-30 เมตร ห่างจากฝั่งประมาณ 30-50 กิโลเมตร ทางฝั่งทะเลอันดามันพบว่าปูทะเลจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 90-200 เมตร ห่างจากฝั่งเป็นระยะทางถึง 80 กิโลเมตร หลังการวางไข่ปูเพศเมียจะกลับไปดำรงชีวิตในป่าชายเลน หรือในพื้นที่ตื้นชายฝั่งที่อยู่อาศัยและสามารถมีไข่นอกกระดองครั้งที่สองและครั้งที่สามได้โดยไม่จำเป็นต้องผสมกับปูเพศผู้อีก แต่ปริมาณไข่ครั้งที่สองและสามจะมีปริมาณน้อยกว่าการได้รับการผสมจากเพศผู้ ปูดำหนึ่งตัวจะมีไข่ประมาณ 1.7-2.5 ล้านฟอง ปูขาวมีไข่ประมาณ 2.2-3.0 ล้านฟอง ปูเขียวมีไข่ประมาณ 2.5-3.2 ล้านฟอง ขึ้นอยู่กับขนาด อายุและความสมบูรณ์ของปู ไข่ปูทะเลที่สมบูรณ์จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 280-380 ไมครอน (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, ม.ป.ป.)

5. วงจรชีวิตและวิวัฒนาการของปูทะเล

ไข่ปูทะเลที่จับปิ้งบริเวณหน้าอกจะฟักเป็นตัวภายใน 10-15 วัน ลูกปูวัยอ่อนมีขั้นตอนการวิวัฒนาการแต่ละระยะผันแปรไปตามความเค็ม อุณหภูมิของน้ำ คุณสมบัติของน้ำทะเลและความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร โดยทั่วไปวิวัฒนาการของปูวัยอ่อน ประกอบด้วย 2 ระยะคือ

ระยะที่ 1 ซูเอีย (zoea) ระยะนี้ลูกปูมีรูปร่างไม่เหมือนพ่อ – แม่ มีขนาดลำตัวประมาณ 0.12-0.35 เซนติเมตร ลูกปูจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 10-12 วัน รยางค์ว่ายน้ำยังไม่เจริญ บริเวณส่วนอกมีหนามที่ส่วนหลัง 1 อัน กรี 1 อัน และด้านข้าง 2 อัน ระยะนี้ลูกปูจะลอกคราบ 5 ครั้ง ลูกปูวัยอ่อนจะล่องลอยตามกระแสน้ำและคลื่นลม อาหารที่กินเป็นแพลงก์ตอนที่มีขนาดเล็กกว่า ซึ่งในขณะที่ตัวอ่อนลอยไปตามกระแสน้ำนั้น จะมีการพัฒนาขึ้นเรื่อย ๆ จนเข้าสู่ระยะเมกาโลปา (megalopa)

ระยะที่ 2 เมกาโลปา (megalopa) ระยะนี้ลูกปูมีขนาดยาวประมาณ 0.45 เซนติเมตร รยางค์ว่ายน้ำทั้ง 5 คู่เริ่มทำงาน ก้ามพัฒนาเด่นชัด เปลือกที่คลุมส่วนหัวรวมทั้งกรียาวประมาณ 0.23 เซนติเมตร กว้างประมาณ 0.16 เซนติเมตร ซึ่งตัวอ่อนจะอาศัยในน้ำที่บริเวณคลื่นสงบ เริ่มจะมีการพัฒนาโครงสร้างเป็นตัวปู หลังจากอยู่ที่ระยะนี้ประมาณ 5-7 วัน จะลอกคราบ หลังจากลอกคราบ 1 ครั้ง ก็จะเป็นตัวปูที่เรียกว่า young crab มีโครงสร้างเหมือนปูเต็มวัย อาศัยอยู่บริเวณแหล่งน้ำกร่อยและป่าชายเลนจนกว่าจะถึงฤดูผสมพันธุ์ (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, ม.ป.ป.) วงจรชีวิตและวิวัฒนาการของปูทะเลแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตและวิวัฒนาการของปูทะเล

ที่มา: Jiansan and Jiaxin (2001)

6. อาหารและลักษณะการกินอาหาร

ปูทะเลเป็นสัตว์หากินกลางคืนโดยออกจากที่หลบซ่อน หลังจากดวงอาทิตย์ตกไปแล้วประมาณ 1 ชั่วโมง และเข้าที่หลบซ่อนก่อนหน้าดวงอาทิตย์ขึ้นเพียงเล็กน้อยหรือหลังจากนั้น

ประมาณ 30 นาที ดังนั้นแสงและอาหารจึงมีอิทธิพลต่อการปรากฏตัวอยู่ภายนอกที่หลบซ่อน สำหรับอาหารที่ตรวจพบในกระเพาะอาหารของปูทะเล ได้แก่ หอยฝาเดียว หอยสองฝา กุ้ง ปู ปลา และเศษพืช ซึ่งปูจะชอบกินปูด้วยกันเองมากที่สุด (สำนักงานกองสนับสนุนการวิจัย, ม.ป.ป.)

อวัยวะสำคัญที่ใช้ในการดักจับเหยื่อ และตรวจสอบวัสดุต่าง ๆ ว่าเป็นอาหารหรือไม่ คือส่วนปลายของขาเดิน อาหารจะถูกส่งเข้าไปในปากผ่านไปถึงกระเพาะแล้วออกสู่ลำไส้ใหญ่ ซึ่งทอดผ่านตับปิ้ง ในที่สุดกากอาหารจะถูกถ่ายออกมาทางปล้องปลายสุดของตับปิ้ง การเลือกแหล่งหากินของปูทะเลแต่ละวัยแตกต่างกัน กล่าวคือ ปูวัยอ่อน (Juvenile) จะหากินบริเวณป่าเลนและอาศัยอยู่ในบริเวณนี้ขณะที่น้ำทะเลได้ลดลงแล้ว ปูวัยรุ่น (Subadult) เป็นพวกตามการขึ้นของน้ำเข้ามาหากินในบริเวณป่าเลนและกลับลงสู่ทะเลไปพร้อม ๆ กับน้ำทะเล และปูโตเต็มวัย (Adult) จะหากินแบบเดียวกับปูวัยรุ่น แต่ส่วนใหญ่จะตระเวนอยู่ในระดับลึกกว่าแนวน้ำลงต่ำสุด (Subtidal level)

7. การลอกคราบ

กระบวนการลอกคราบ (molting process) เป็นกระบวนการที่รวมเหตุการณ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นก่อนและหลังการสลัดคราบออก (ecdysis หรือ exuviation) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงของสารต่าง ๆ รวมทั้งมีการเจริญเติบโตเกิดขึ้นด้วย เนื่องจากกระดองปูเป็นสารประกอบหินปูนมีความแข็งแรงมากทำให้ไม่สามารถขยายตัวได้ ระยะเวลาในการลอกคราบในแต่ละครั้งจะห่างกันเท่าใดนั้น ขึ้นกับขนาด อายุ ความสมบูรณ์ของปูทะเลและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เหมาะสมด้วย

เมื่อปูลอกคราบ ความดันภายในตัวปูจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เมื่อถึงระดับหนึ่งจะดันเปลือกเก่าให้แตกออกตามรอยประสาน ปูจะใช้หลังดันกระดองด้านบนให้รอยต่อระหว่างส่วนหัวและอกกับท้องเผยออออก จากนั้นจะดันตัวออกโดยมีขาคู่หลังหรือกรรเชียงออกมาก่อน เมื่อรยางค์ส่วนนั้นได้ปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมภายนอกแล้ว ปูจึงถอดอวัยวะส่วนอื่น ๆ ตามออกมา โดยมีก้ามเป็นรยางค์สุดท้าย ระยะเวลาในการที่ปูลอกคราบจนกระทั่งกระดองใหม่แข็งนั้นใช้เวลาประมาณ 7 วัน หลังจากนั้นปูเริ่มสะสมอาหารไว้เพื่อการลอกคราบครั้งต่อไป ปัจจัยที่มีผลต่อการลอกคราบของปูทะเลได้แก่ แสง อุณหภูมิ และความเค็ม ระบบฮอร์โมนในร่างกาย และความสมบูรณ์ของร่างกาย

การตรวจสอบการลอกคราบของปูทะเลสามารถดูจากขาว่ายน้ำบริเวณโพรโพดัส (propodus) ในวงจรการลอกคราบของปูทะเล (*S. serrata*) โดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ได้แก่

ระยะหลังการลอกคราบตอนต้นหรือระยะ A (Early postmolt stage) ระยะหลังลอกคราบหรือระยะ B (Postmolt stage) ระยะคราบแข็งหรือระยะ C (Intermolt stage) ระยะก่อนลอกคราบหรือระยะ D (Premolt stage) ระยะการลอกคราบที่มีการจำแนกไว้นี้ ยังจะสามารถแยกย่อยได้อีก 9 ระยะด้วยกัน ได้แก่ ระยะ A, B, C1, C2, C3, D1, D2, D3 และระยะ E (Pratoomchat *et al*., 2002)

บรรจง และ บุญรัตน์ (2545) กล่าวว่า การลอกคราบของปูทะเล สามารถแบ่งออกได้ 5 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 กระดองนิ่ม: Stage A (newly molt) เป็นระยะที่ปูเพิ่งเสร็จจากการลอกคราบ กระดองใหม่นิ่ม เหี่ยวย่น ลื่น ชั้นเคลือบผิว ชั้นเม็ดสีและเยื่อบุต่างๆ จะติดเป็นชั้นเดียวกัน ระยะนี้ปูจะไม่กินอาหาร

ระยะที่ 2 กระดองเริ่มแข็ง: Stage B (paper shell) ระหว่างที่เริ่มมีการพัฒนา เคลือบผิวชั้นในมีลักษณะหนาและแข็ง ชั้นเม็ดสีเริ่มมีการถอยกลับ ซึ่งระยะนี้ปูยังไม่กินอาหาร

ระยะที่ 3 เปลือกแข็ง: Stage C (intermolt) กระดองมีความแข็งเต็มที่ ผิวชั้นนอกของเปลือกสมบูรณ์ ชั้นเม็ดสีถอยกลับไปอยู่บริเวณฐานปลายสุดของขน (saetae) เก่า ผิวชั้นนอกมีการหดกลับ เปลือกปูเริ่มแข็ง ในระยะนี้ปูจะกินอาหารมาก

ระยะที่ 4 ก่อนการลอกคราบ: Stage D กระดองมีความแข็งเต็มที่ เปลือกสมบูรณ์ เป็นระยะที่ปูสะสมสารอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการลอกคราบ เช่น แคลเซียม เพื่อใช้ในการสร้างเปลือกใหม่ ระยะนี้ไปปูจะกินอาหารลดลง

ระยะที่ 5 ลอกคราบ: Stage E (molting) เป็นระยะที่ปูสลัดกระดองเก่าทิ้ง น้ำถูกดึงเข้าตัวอย่างรวดเร็ว เพื่อให้เปลือกเก่าปริออก ระยะนี้ปูจะไม่เคลื่อนที่ ไม่กินอาหาร เป็นช่วงเวลาที่วิกฤตของปูทะเล

8. ปูนิ่ม

ปูนิ่ม หมายถึง ปูที่ลอกคราบเสร็จสิ้นไม่นาน ซึ่งกระดองของปูยังไม่มีความแข็ง ในช่วงนี้ปูยังไม่สามารถกินอาหารและป้องกันตัวเองได้ หลังจากผ่านการลอกคราบมา 3 วัน ปูจึงแข็งแรง ช่วงระยะเวลาในการลอกคราบไม่เกิน 2-4 ชั่วโมง ปูยังมีกระดองนิ่มสามารถนำไปปรุงอาหารได้ ปูนิ่มจะมีความพิเศษ คือ มีความสะอาดในทุกส่วน เนื่องจากคราบเก่าถูกลอกออกไปหมด อวัยวะทุกส่วนขยายตัวก่อนลอกคราบ 2 วัน ระยะเวลานั้นปูจะไม่กินอาหาร กระเพาะว่างเปล่า ไม่มีเศษอาหารในช่องท้อง (วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีระนอง, ม.ป.ป.)

9. การเลี้ยงปูนิ่ม

9.1 การเลี้ยงปูนิ่มในประเทศไทย

จังหวัดที่มีการเลี้ยงปูนิ่ม ได้แก่ ตราด สมุทรปราการ ชุมพร ระนองและสตูล ปูที่นำมาทำปูนิ่มควรเป็นปูดำ เพราะปูขาวและปูเขียวมีราคาสูงกว่าปูดำ ขนาดที่เหมาะสมคือขนาดกระดองกว้างประมาณ 5-6 เซนติเมตร (ประมาณ 15-18 ตัว/กิโลกรัม) เมื่อลอกคราบแล้วจะได้ปูขนาด 8-9 เซนติเมตร (ประมาณ 10-12 ตัว/กิโลกรัม) ถ้านำปูที่ขนาดใหญ่ขึ้น มาทำปูนิ่ม ต้นทุนในการซื้อพันธุ์ปูจะสูง เวลาที่ใช้ผลิตปูแต่ละรุ่นจะนานขึ้นด้วย ปูที่ใช้ควรเป็นปูเพศผู้ที่อยู่ในระยะลอกคราบที่ 3 ถ้าเป็นปูอยู่ในระยะที่ 2 หรือที่ชาวบ้านเรียกว่า ปูโพรกนั้น ต้องเลี้ยงให้เป็นปูแน่นเสียก่อน ถ้าเป็นปูตัวเมียควรเป็นปูที่มีขนาดจับปิ้งอยู่ในขั้นที่ 1-3 (บรรจง และบุญรัตน์, 2545)

การทำฟาร์มปูนิ่มในปัจจุบันตามเอกสารเผยแพร่ของวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีระนอง (ม.ป.ป.)

แบบที่ 1 แบบปล่อยเลี้ยงลงในดิน บ่อที่เลี้ยงต้องมีการกั้นด้วยกระเบื้องหรือไม้ไผ่เพื่อป้องกันการหนีของปู หว่านอาหารพวกปลาสดวันละมื้อในช่วงเช้า มีประตูน้ำเข้า– ออก เมื่อน้ำลงจะรวบรวมปูทะเลที่ลอกคราบ การเลี้ยงแบบนี้ปูนิ่มจะมีคุณภาพต่ำ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของโคลนและต้องอาศัยการขึ้นลงของน้ำทะเล และที่สำคัญถ้าเลี้ยงปูหนาแน่นมาก ปูจะกินกันเอง

แบบที่ 2 การเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ เป็นวิธีที่นิยม เนื่องจากสะดวกในการดูแลบ่อเลี้ยง สามารถทำได้ง่าย โดยใช้อิฐบล็อก 3-4 แถว ความสูงประมาณ 0.5-1.0 เมตร ต้นทุนต่ำ ใส่น้ำที่ระดับความสูงไม่เกิน 50 เซนติเมตร ควรปล่อยปูให้มีขนาดเดียวกันเพื่อป้องกันการกัดกันเอง ตรวจสอบการลอกคราบทุก 4 ชั่วโมง หากไม่ตรวจสอบปูที่ลอกคราบจะถูกตัวที่แข็งแรงกว่ากิน เกษตรกรจึงแก้ไขโดยตัดก้ามปูและขาให้เหลือแต่พาย ปัญหาที่ตามมาคือปูจะเครียดและตายประมาณร้อยละ 10-20 น้ำหนักของปูหลังลอกคราบจะลดลงกว่าปูที่มีรยางค์ครบประมาณร้อยละ 20-25 ราคาของปูนิ่มที่มีอวัยวะไม่ครบจะต่ำกว่าที่มีอวัยวะสมบูรณ์

แบบที่ 3 การเลี้ยงในตะกร้าพลาสติก การเลี้ยงแบบนี้ใช้ต้นทุนสูงกว่าชนิด อื่น ๆ เนื่องจากตะกร้า 1 ตะกร้าเลี้ยงปู 1 ตัว มีความสะดวกในการดูแลและปูนิ่มที่ได้มีคุณภาพสูง เป็นที่ต้องการในประเทศและต่างประเทศ มีราคาสูงเนื่องจากมีอวัยวะครบสมบูรณ์

9.2 การเลี้ยงปูนิ่มในต่างประเทศ

วิธีการทำปูนิ่ม *Callinectes sapidus* ที่มลรัฐ South Carolina ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนใหญ่ จะเลี้ยงปูในกระชัง หรือในบ่อซีเมนต์ วิธีการต้องทำการแยกปูที่ใกล้ลอกคราบออกจากปูกระดองแข็ง ทำให้ปูกำลังลอกคราบไม่ได้รับอันตรายจากปูกระดองแข็ง วิธีการเลี้ยงและการจัดการปูลอกคราบมีความสำคัญมาก จากประสบการณ์ของผู้เลี้ยงปูนิ่ม สามารถแบ่งปูออกเป็น 4 ระยะตามการปรากฏสีของรยางค์ขาเดินคู่ที่ 5 ได้แก่ White-line, Pink-line, Red-line และ Buster นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการที่จะแยกตั้งแต่ระยะก่อนการลอกคราบ เพราะการกินอาหารจะลดลง ทำให้สะดวกในการจัดการ (Whitaker *et al.*, 1987)

การเปลี่ยนแปลงสีของตับปิ้งสามารถใช้เป็นจุดสังเกตได้ว่าปูใกล้ลอกคราบหรือยัง การเปลี่ยนแปลงสีจะสังเกตได้จากตับปิ้งของปูเพศผู้และปูเพศเมียจะมีการเปลี่ยนสีเมื่อใกล้ลอกคราบ โดยตับปิ้งของเพศผู้จะมีสีค่อนข้างเหลืองเมื่อใกล้ลอกคราบ ขณะที่ปูเพศเมียใกล้ลอกคราบสีตับปิ้งจะมีเปลี่ยนเป็นสีชมพูอมม่วงหรือน้ำเงินเข้มปรากฏเป็นชั้น ๆ ปูเพศเมียที่เจริญพันธุ์เมื่อใกล้ลอกคราบระยะสุดท้ายสีตับปิ้งจะปรากฏเป็นสีโทนดำมากกว่าปูเพศเมียที่ยังไม่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์

การเปลี่ยนแปลงสีของรยางค์ขาเดินคู่ที่ 5 (paddle fins) ของปู ส่วนใหญ่แล้วจะมีลักษณะใส แต่เมื่อใกล้ลอกคราบจะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีอย่างชัดเจน โดยสังเกตจากขอบด้านนอก

ของสองข้อต่อสุดท้ายของรยางค์ขาเดินคู่ที่ 5 เมื่ออยู่ในระยะ white-line peeler, green peeler และ hard crab ทั้ง 3 ระยะนี้รยางค์ขาเดินคู่ที่ 5 จะมีลักษณะบางใสติดกับภายในของขอบด้านนอกของขาเดินคู่ที่ 5 (dactylopodite และ propodus) ในระยะ pink-line peeler จะมีลักษณะบางใส แต่ลักษณะขอบด้านนอกของขาเดินคู่ที่ 5 จะมีสีชมพูหรือสีม่วงอ่อน ในระยะ red-line peeler อยู่ในช่วง 3 วันสุดท้ายก่อนการลอกคราบ ลักษณะของขอบด้านนอกของขาเดินคู่ที่ 5 จะมีสีแดงเข้มหรือสีม่วงเข้ม เส้นสีแดงนี้จะสังเกตได้ง่ายกว่าเส้นสีชมพู ในระยะ buster เป็นระยะสุดท้ายของการลอกคราบและเป็นระยะที่สังเกตได้ง่ายที่สุด

การเรียนรู้ถึงวิธีการแยกปูนิ่ม จะมีวิธีการแยกอยู่ 2 วิธี คือ Nicking และ Pinching สำหรับ Nicking เป็นลักษณะรอยแตกตรงบริเวณก้าม ซึ่งจะเป็นตัวบ่งบอกว่าปูกำลังจะลอกคราบ โดยเฉพาะระยะ pink-line peeler ส่วนระยะ red-line peeler ตรงบริเวณก้ามจะแตกหักได้ง่ายมากซึ่งในระยะนี้ถ้าบริเวณปลายสุดของก้ามเกิดการแตกหักจะทำให้การลอกคราบของปูเกิดขึ้นได้ยาก ปูจะไม่สามารถลอกคราบเนื่องจากเกิดการติดเชื้อและตายในที่สุด สำหรับระยะ white-line peeler และระยะ green peeler จะไม่มีการแตกหักตรงบริเวณก้าม ถึงแม้ว่าการดูปูนิ่มใน North Carolina จะใช้วิธีการแยกแบบ Nicking แต่กระบวนการนี้ทำให้เกิดความเสียหายแก่ปูนิ่มมากกว่าวิธีอื่น

Pinching เป็นการสังเกตลักษณะของปลายขาเดินคู่ที่ 5 วิธีการนี้เหมาะสำหรับผู้ที่ยังไม่มีประสบการณ์ในการจำแนกระยะการลอกคราบ โดยการตัดส่วนปลายนำมาส่องดูชั้นเนื้อเยื่อพบว่ามีระยะการเปลี่ยนแปลงของชั้นเนื้อเยื่อจากปู White-line peelers ซึ่งจะแยกจากขอบด้านนอกของปลายรยางค์ขาเดินคู่ที่ 5 Pink-line และ Red-line peelers ที่มีลักษณะใส จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูและสีแดง เมื่อปูใกล้ที่จะลอกคราบ

การสังเกตสีบริเวณปลายรยางค์ขาเดินคู่ที่ 5 ของปู blue crab ใน North Caroline สีที่ปรากฏบนขอบของขาว่ายน้ำ ใช้ทำนายระยะเวลาที่เหลือก่อนเข้าสู่ระยะลอกคราบ (Whitaker *et al.*, 1987) ได้ดังนี้ ระยะกระดองแข็ง 20-50 วัน, ระยะ Green Peeler 10-25 วัน, ระยะ White Line Peeler 5-14 วัน, ระยะ Pink Line Peeler 2-6 วัน, ระยะ Red Line Peeler 1-3 วัน และระยะ Buster น้อยกว่า 1 วัน

10. การเก็บเกี่ยวปูนิ่มและการบรรจุหีบห่อ

หลังการปล่อยปูเลี้ยงในตะกร้า ควรตรวจดูการลอกคราบของปูทุก 4 ชั่วโมง เมื่อปูลอกคราบต้องรีบเก็บนำไปแช่น้ำจืดเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อทำความสะอาดและล้างน้ำเค็มออก บางครั้งมีการฆ่าเชื้อด้วยโอโซน จากนั้นนำไปใส่กล่องโรยด้วยน้ำแข็ง เป็นการทำให้สลบด้วยความเย็นทันที และทำให้มีความสด ระยะเวลาตั้งแต่เก็บปูจนนำไปแช่น้ำแข็งควรอยู่ในระยะเวลา 4 ชั่วโมง หากเกินจากนั้น กระดองปูจะเริ่มแข็ง เมื่อใช้มือลูบจะมีลักษณะเป็นกระดาษ ถือว่ามีคุณภาพต่ำ หลังจากนั้นนำไปแช่แข็ง และรอการจำหน่ายต่อไป (บรรจง, 2545; วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีระนอง, ม.ป.ป.)

ในสหรัฐอเมริกา พบว่า อุตสาหกรรมการเลี้ยงปูนิ่มและการส่งออก สามารถแบ่งขนาดของปูนิ่มออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ Whales, Jumbo, Primes, Hotels และ Medium ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมีขนาดของตัวปูและน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวในปริมาณต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ขนาดความกว้างของกระดองภายนอกและน้ำหนักโดยเฉลี่ยต่อตัวของปูนิ่มสด

ขนาด	ความกว้างของกระดองภายนอก (เซนติเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ยของปูนิ่ม/ตัว (กรัม)
Whales	>14	165
Jumbo	13-14	130
Primes	11-13	95
Hotels	10-11	70
Medium	9-10	50

ที่มา: ดัดแปลงจาก Handy Company (n.d.)

11. คุณค่าทางเศรษฐกิจ

ปูนิ่มเป็นสินค้าเพิ่มมูลค่าของปูที่ได้รับความนิยมบริโภคอย่างมากในทวีปอเมริกาและ

ยุโรป ซึ่งผู้ผลิตปูนิ่มรายใหญ่ของโลกคือสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตปูนิ่มได้มากขึ้น โดยผลิตกันมากในจังหวัดระนอง ซึ่งพบว่า มีปูนิ่มเข้าสู่ตลาดเดือนละประมาณ 1,500 ตัน ราคาของปูนิ่มขึ้นอยู่กับขนาดของปู กล่าวคือ ปูนิ่มขนาดเล็กจะมีราคาประมาณกิโลกรัมละ 220 บาท ขนาดกลางประมาณกิโลกรัมละ 250 บาท ขนาดใหญ่กิโลกรัมละ 280 บาท และขนาดใหญ่พิเศษประมาณกิโลกรัมละ 300-350 บาท จะเห็นได้ว่ามูลค่าของปูนิ่มสูงกว่าปูสดมาก ในอนาคต หากประเทศไทยสามารถพัฒนาเทคโนโลยีการเลี้ยงปูนิ่มที่สามารถควบคุมระยะเวลาการลอกคราบ ควบคุมมาตรฐานของฟาร์มและควบคุมคุณภาพของปูนิ่ม จนได้มาตรฐานที่สากลยอมรับก็จะทำให้ปูนิ่มของประเทศไทยเข้าสู่ตลาดสากลและนำเงินสู่ประเทศอย่างมาก (บรรจง, 2546)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าเทคโนโลยีการเลี้ยงปูนิ่มในประเทศไทยจะได้ผ่านขั้นตอนการทดสอบความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์มาระดับหนึ่งแล้วก็ตาม แต่ยังคงพบปัญหาในเรื่องของคุณภาพของผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว อันเนื่องมาจากการขาดความรู้และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ ปัญหาในเรื่องการสูญเสียความแน่นเนื้อภายหลังการลอกคราบ ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส อีกทั้งยังพบปัญหาในเรื่องการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ (enzymatic browning reaction) อีกด้วย

ดัชนีการวัดความสดของสัตว์น้ำ

ดัชนีวัดความสดที่เหมาะสมของสัตว์น้ำแต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกัน เนื่องจากหลังจากสัตว์น้ำตายการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและอัตราเร็วของการเปลี่ยนแปลงของสัตว์น้ำแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน ระดับของสารที่ใช้เป็นดัชนีการตรวจสอบความสดจึงไม่เท่ากัน และผลที่ได้จากการตรวจสอบจากดัชนีแต่ละตัวที่ใช้วัดความสดจะมีความแปรปรวนเกิดขึ้น ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ฤดูกาล อาหาร แหล่งที่อยู่อาศัยและสภาพการเก็บรักษา การเลือกใช้วิธีการในการตรวจสอบความสดของสัตว์น้ำแต่ละชนิดต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่ตรวจสอบ การตรวจวัดความสดทางเคมีที่นิยมใช้ตรวจสอบ ได้แก่

1. K-value

ค่า K ใช้เป็นดัชนีการวัดค่าความสดของปลาภายหลังจากที่ปลาตายทันที เมื่อปลาตาย การส่งผ่านออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ หยุดชะงัก เนื่องจากหัวใจหยุดทำงาน และไม่มีกระแสโลหิต

ไหลเวียน การสังเคราะห์พลังงานของกล้ามเนื้อสัตว์น้ำจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงต่างจากสภาวะที่มีออกซิเจน กล้ามเนื้อไม่สามารถรักษาระดับของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate; ATP) ไว้ได้ ทำให้เกิดการสลายตัวของ ATP (ATP degradation) ได้เป็นอะดีโนซีนไดฟอสเฟต (adenosine diphosphate; ADP), อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate; AMP), อินโนซีนโมโนฟอสเฟต (inosine monophosphate; IMP), อินโนซีน (inosine; HXR), ไฮโปแซนทีน (hypoxanthin; HX) และน้ำตาลไรโบส สารประกอบไฮโปแซนทีนสามารถสลายตัวเกิดเป็นสารประกอบแอมโมเนีย ซึ่งทำให้ความเป็นกรดเบสของปลาเพิ่มขึ้นและทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ โดยที่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงจะเร่งการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของ ATP ให้สูงขึ้น ทำให้คุณภาพปลาเสื่อมเร็วขึ้นด้วย Egan *et al.*(1981) พบว่า ปลาภายหลังการตายทันทีจะมีค่า K น้อยกว่าร้อยละ 5 และเมื่อปลาเน่าเสียจะมีค่า K มากกว่าร้อยละ 60 Botta (1995) ได้แสดงสูตรการคำนวณหาค่า K คือ

$$K (\%) = \frac{(HXR + HX)}{(ATP + ADP + AMP + IMP + HXR + HX)} \times 100$$

2. ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base nitrogen; TVB-N)

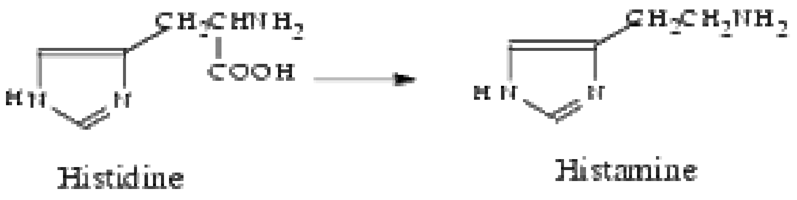
TVB-N เป็นดัชนีวัดการเน่าเสียโดยวัดปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ในสัตว์น้ำหรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ทำให้ปลาเน่าเสีย เกิดเป็นไตรเมธิลเอมีน (trimethyl amine; TMA), ไดเมธิลเอมีน (dimethyl amine; DMA) และแอมโมเนีย (NH_3) เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับวัดการเน่าเสียของปลาและสัตว์น้ำบางชนิด โดยทั่วไปปริมาณ TVB-N จะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาสัตว์น้ำเพิ่มขึ้น ค่า TVB-N ในปลาสดควรมีค่าต่ำกว่า 12 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม ปลาที่ยังบริโภคได้มีค่า TVB-N 12-20 มิลลิกรัมไนโตนเจน/100 กรัม (Banks *et al.*, 1980) ปลาที่เริ่มเสื่อมคุณภาพแต่ยังบริโภคได้มีค่า TVB-N 20-25 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม และปลาที่เน่าเสียแล้วมีค่า TVB-N สูงกว่า 25 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม (Castel, 1946)

3. ฮีสตามีน

ฮีสตามีนเป็นสารเอมีนที่ระเหยไม่ได้ พบมากในปลาทะเล โดยเฉพาะปลาทูน่า ปลาโอ ปลาแมคเคอเรล เนื่องจากปลากลุ่มนี้มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดฮีสติดีนสูงกว่าปลาชนิดอื่น

ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นฮีสตามีนโดยเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส (histidine decarboxylase) ที่สร้างโดยแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาจากเหงือก เมือก เกลือ อากาศ หรือแม้กระทั่งการขนส่ง โดยกระบวนการดีคาร์บอกซิเลสหรืออาจเกิดจากกระบวนการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ในตัวปลาเอง (เยาวลักษณ์, 2543; Arnold and Brown, 1978; Ababouch, 1991)

สูตรโครงสร้างทางเคมีของฮีสตามีน คือ 2-(4-imidazolyl) ethylamine หรือ $C_5H_9N_3$ ซึ่งสังเคราะห์ได้โดยกระบวนการคาร์บอกซิเลชั่น กรดอะมิโนฮีสติดีนโดยเอนไซม์แอล-ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย และจากกระบวนการย่อยสลายตัวเองในปลา ดังในภาพที่ 4 (เยาวลักษณ์, 2543; Emanuel, 1999; Janeway *et al*., 1999)



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างทางเคมีและกระบวนการสังเคราะห์ฮีสตามีน
ที่มา: Allain (2004)

อาการเป็นพิษของฮีสตามีนมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย (immune response) ส่งผลให้เกิดอาการภูมิแพ้ (allergic reaction) เช่นเดียวกันกับฝุ่นละอองหรือเกสรดอกไม้ และยังมีผลต่อระบบทางเดินอาหาร ระบบหมุนเวียนโลหิต และระบบประสาท ปริมาณฮีสตามีนที่พบในเนื้อปลามีผลต่อระดับความรุนแรงของพิษที่เกิดขึ้น ในหลายประเทศได้กำหนดปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ประมงระดับที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Hazard Action Level; HAL) ในปลาทูน่าที่ 50 มิลลิกรัม/ 100 กรัมตัวอย่าง และระดับฮีสตามีนที่ทำให้อาหารมีข้อบกพร่อง (Defect Action Level; DAL) ที่ 20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง (Emanuel, 1999; Janeway *et al*., 1999; Sikorski, 1990)

4. ฟอร์มัลดีไฮด์

สัตว์น้ำบางชนิด ประกอบด้วยเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนไตรเมธิลเอมีนออกไซด์ (TMAO) ไปเป็นไดเมธิลเอมีน และฟอร์มัลดีไฮด์ (FA) (Yamada *et al*., 1969; Crawford *et al*., 1979) ดังสมการ

$$(CH_3)_3\,NO \longrightarrow (CH_3)_2\,NH + HCOH$$

การสลายตัวของไตรเมธิลเอมีนออกไซด์เป็นสาเหตุทำให้โปรตีนในเนื้อปลาเปลี่ยนสภาพ (Rodger and Hastings, 1984) เอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการเปลี่ยนไตรเมธิลเอมีนออกไซด์ไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ คือ ไตรเมธิลลามีนออกไซด์ดีเมธิเลส (TMAO demethylase) (Da Ponte *et al*., 1986) ซึ่งพบมากในปลากลุ่ม gadoid เช่น hake, haddock และ cod เป็นต้น (Yamada and Amano, 1965; Yamada *et al*., 1969) โดยเฉพาะในส่วนของเครื่องในและกล้ามเนื้อดำ (Gill and Paulson, 1982) และพบเอนไซม์ไตรเมธิลามีนออกไซด์ดีเมธิเลส ในกล้ามเนื้อขาวในระดับต่ำ (Rehbein, 1988) อย่างไรก็ตามกระบวนการรีดักชั่นของไตรเมธิลเอมีนออกไซด์ ไปเป็นไดเมธิลเอมีนและฟอร์มัลดีไฮด์สามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ โดยอาศัยซีสเตอีน รวมทั้งเฟอร์รัสไอออน หรือฮีโมโกลบินเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Spinelli and Koury, 1979)

เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อได้แก่ เปปติเดส (peptidase) โปรติเอส (protease) โปรติเนส (proteinase) เปปไทด์ไฮโดรเลส (peptidehydrolase) และเอนไซม์โปรติโอไลติค (proteolytic enzyme) มีลักษณะปฏิกิริยาสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ (ปราณี, 2547)

1. ประเภทของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสแบ่งเป็น 4 กลุ่ม (ปราณี, 2547) ตามกลไกการทำงานดังนี้

1.1 ซีรีนโปรติเอส โปรติเอสชนิดนี้มีหมู่อนุมูลซีรีนอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ และเป็นพวกอัลคาไลน์โปรติเอส ซึ่งมีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสำหรับเกิดปฏิกิริยาคือช่วง 7-11 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไคโมทริพซินและทริพซิน

1.2 ซัลไฟดริลโปรติเอส โปรติเอสชนิดนี้มีหมู่อนุมูลซัลไฟดริล อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์และเป็นนิวทรัลโปรติเอส ซึ่งมีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสำหรับเกิดปฏิกิริยาคือช่วง 6-7.5 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืช ได้แก่ ปาเปนและบรอมิเลน เป็นต้น

1.3 เมทาโลโปรติเอส โปรติเอสชนิดนี้มีอิออนและโลหะรวมในโมเลกุลของเอนไซม์ และเป็นนิวทรัลโปรติเอส ซึ่งมีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสำหรับเกิดปฏิกิริยาคือช่วง 6.5-7.5 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ คาร์บอกซีเปปติเดส

1.4 แอซิดโปรติเอส โปรติเอสชนิดนี้มีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสำหรับเกิดปฏิกิริยาคือช่วง 2-4 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เรนนินและเปปซิน

บทบาทของโปรติเอสในสัตว์ที่อยู่ในกลุ่มครัสเตเชียน มีหลากหลายด้วยกัน เช่นโปรติเอสที่พบในเฮพาโทแพนเครียส (hepatopancreas) ของกุ้ง ได้แก่ เอนไซม์คล้ายทริพซิน (trypsin-like) และคาเทพซิน-ซี (cathepsin-c) ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์เป็นตัวช่วยในกระบวนการวินิจฉัยทางการแพทย์และการผลิตอาหารสัตว์ (Haard, 1994) นอกจากนี้โปรติเอสยังมีบทบาททำให้เกิดลักษณะด้อยคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของสัตว์น้ำภายหลังการตายนิ่มเละ (Jiang, 2000) Haard (1994) พบว่า เอนไซม์คล้ายทริพซิน และคอลลาจีเนส (collagenase) ซึ่งถูกหลั่งออกมาจากเฮพาโทแพนเครียสจะทำให้เนื้อกุ้งและผลิตภัณฑ์จากกุ้งมีเนื้อนิ่มเละ และไพรัตน์ (2527) พบว่า โปรติเอสในหัวกุ้งได้แก่ คาเทพซิน เปปติเดส ดีคาร์บอกซีเลส (decarboxylase) และดีอะมิเนส (deaminase) ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนในหัวกุ้งได้สารประกอบย่อยและกรดอะมิโนอิสระซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และระหว่างการเก็บกุ้งถ้ามีอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้เกิดการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ Vonk (1960) กล่าวว่าการเก็บเอนไซม์ที่ได้มาจากลำไส้เล็กของกุ้งไว้ที่อุณหภูมิสูงจะทำให้กิจกรรมโปรติโอไลติคสูงกว่าเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำนอกจากนี้ยังสามารถพบอัลคาไลน์โปรติเอสในซาร์โคพลาสซึม (sarcoplasm) ของเซลล์กล้ามเนื้อของสัตว์ทะเลอีกด้วย (Dahlmann and Reinauer, 1978; Makinodon *et al*, 1982)

2. แหล่งของเอนไซม์โปรติเอสในสัตว์น้ำ

เอนไซม์โปรติเอสในสัตว์น้ำมักพบอยู่ใน 3 แหล่ง (Shahidi and Botta, 1994) ดังนี้

2.1 โปรติเอสในกระเพาะอาหาร (gastric protease) โปรติเอสในกระเพาะอาหารของสัตว์ทะเล ได้แก่ เปปซิน (pepsin) แกสตริคซิน (gastricsin) และไคโมซิน (chymosin) เรียกเอนไซม์นี้ว่าคาร์บอกซิลโปรติเอส ซึ่งจะถูกเร่งการทำงานด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพียงเล็กน้อย

ดังนั้นจึงเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากสัตว์ทะเลที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นส่วนประกอบ

2.2 โปรติเอสในลำไส้เล็ก (intestinal protease) โปรติเอสในลำไส้เล็กของสัตว์ทะเลสร้างมาจากไพโลริคซีกา (pyloric ceca) หรือตับ ได้แก่ เอนไซม์คล้ายทริพซิน ไคโมทริพซิน (chymotrypsin) คอลลาจีเนส อีลาสเตส (elastase) และคาร์บอกซีเปปติเดส

2.2.1 ทริพซิน เป็นซีรีนโปรติเอส มักจะมีหลายรูป (isozyme form) ซึ่งจะถูกเร่งการทำงานในสภาวะที่แตกต่างกัน ทริพซินของปลาหลายชนิดมีสมบัติไม่สามารถทนต่อความร้อนและค่าความเป็นกรดเบสต่ำ แต่จะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่อุณหภูมิต่ำโดยเฉพาะทริพซินจากปลาที่อาศัยอยู่ในทะเลลึก

2.2.2 ไคโมทริพซินและเอนไซม์คล้ายไคโมทริพซิน เป็นซีรีนโปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับทริพซิน คือ ไม่ทนต่อสภาวะกรด

2.2.3 คอลลาจีเนส สร้างมาจากไพโลริคซีกา พบว่ามีมากอยู่ในส่วนที่เก็บสะสมไขมัน การทำงานของเอนไซม์เหมือนกับทริพซินและไคโมทริพซิน

2.3 โปรติเอสในเฮพาโทแพนเครียส (hepatopancreas protease) เช่น คาร์บอกซีเปปติเดส และคาเทพซิน-ซี และซีรีนโปรติเอส ได้แก่ เอนไซม์คล้ายทริพซินและคอลลาจีเนสถูกปล่อยออกมาในเนื้อของกุ้ง ปู หอย ทำให้เนื้อของสัตว์ทะเลนิ่มเละ

ประจวบ (2537) กล่าวว่า เฮพาโทแพนเครียสเป็นต่อมสร้างน้ำย่อยของสัตว์ไม่มีกระดูก-สันหลัง ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันระหว่างตับและตับอ่อน ในสัตว์ชั้นสูงต่อมนี้ประกอบด้วยท่อตันหรือถุงตัน (deverticula) เปิดออกสู่ท่อ (duct) ที่จะทำหน้าที่หลั่งน้ำย่อยออกมา และ Vonk (1960) รายงานว่าเฮพาโทแพนเครียสเป็นอวัยวะที่มีการหลั่งกรดน้ำดี นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งที่มีการสะสมไกลโคเจน ไขมัน และแคลเซียม รวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญโปรตีนด้วย

3. การสกัดเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในเนื้อเยื่อสัตว์ เป็นเอนไซม์ที่ละลายได้ง่าย Palmer (1991) กล่าวว่า การสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อสัตว์ต้องรีบตัดเนื้อเยื่อสัตว์ทันทีที่สัตว์ตาย แล้วมานำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อลดการเกิดกระบวนการย่อยตัวเอง ซึ่งในการสกัดเอนไซม์ต้องทำลายเมมเบรน โดยปั่นผสมเนื้อเยื่อในสารละลายที่มีค่า ionic strength ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะการจับกันระหว่างเอนไซม์กับเมมเบรนของเนื้อเยื่อดังต่อไปนี้

3.1 เอนไซม์จับเมมเบรนอย่างหลวม (loosely bound) สกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนโดยการสกัดในสารละลายที่มีค่า ionic strength สูง ๆ เนื่องจากเมมเบรนส่วนใหญ่ประกอบด้วยโมเลกุลไม่มีขั้วจึงยึดเกาะกันด้วย nonpolar interaction เมื่อมีการเติมหมู่ประจุให้แก่สารละลายเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นจะทำให้สกัดเอนไซม์จากเมมเบรนได้มากขึ้น (Price and Stevens, 1982)

3.2 เอนไซม์จับเมมเบรนอย่างแน่น (tightly bound) สกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนโดยการสกัดในสารละลายที่มีค่า ionic strength ต่ำ ๆ หรือ nonionic detergent ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้แก่ Brij และ Triton-x ซึ่งสารละลายดังกล่าวทำหน้าที่เป็น detergent ทำให้สกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนได้ และเอนไซม์จะละลายออกมาในสารละลายที่ใช้สกัด (Price and Stevens, 1982)

ดังนั้นสารละลายที่จะนำมาใช้สกัดเอนไซม์จะต้องคำนึงถึงค่า ionic strength และต้องมีค่าความเป็นกรดเบสใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อ ซึ่งจะมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่สกัดได้และกิจกรรมของเอนไซม์ ตัวอย่างการสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่มีผู้ทำการศึกษามาแล้วมีดังนี้

Eitenmiller (1974) กล่าวถึงการสกัดเอนไซม์คาเทพซินจากเนื้อกุ้ง หลังจากล้างกุ้งให้สะอาดแล้ว นำเนื้อกุ้ง 25 กรัม ปั่นผสมด้วยสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์เย็นร้อยละ 2 เข้าเครื่องเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยอัตราเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนของเหลวซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์คาเทพซินไว้ที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส

Baranowski *et al.* (1984) รายงานการสกัดเอนไซม์จากเฮพาโทแพนเครียสของกุ้งโดยใช้ตัวอย่าง 50 กรัม นำมาปั่นผสมในสารละลายทริสไฮโดรคลอริคเย็น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ ใช้ความเร็วในการผสมต่ำ นาน 5 นาที เข้าเครื่อง

เหวี่ยงแยกตะกอนด้วยอัตราเร็ว 2,000xg นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส กรองส่วนของเหลวด้วย glass wool ส่วนตะกอนที่เหลือนำมาสกัดซ้ำ หลังจากนั้นรวมส่วนของเหลวที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอนด้วยอัตราเร็ว 12,000xg นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วกรองผ่านแผ่นกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บส่วนของเหลวที่ได้ซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส

Hernandez-Cortes *et al.* (1997) สกัดไคโมทริพซินโดยนำเฮพาโทแพนเครียสจากหัวกุ้งขาวแวนาไม (*Panaeus vannamei*) มาปั่นผสมในน้ำเย็นด้วยอัตราส่วน 1:15 (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วเหวี่ยงแยกกำจัดตะกอนออกด้วยอัตราเร็ว 4,500xg นาน 30 นาที

Hameed and Haard (1985) สกัดเอนไซม์คาเทพซิน-ซี จากเฮพาโทแพนเครียสของหมึกแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นำมาละลายที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง แล้วปั่นละเอียดในโซเดียมเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตต (Na-EDTA) 1.78 มิลลิโมลาร์ นาน 2 นาที ด้วยอัตราเร็วสูงสุดของเครื่องปั่นผสม โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเนื้อเยื่อต่อสารละลายที่ใช้สกัดเท่ากับ 2 : 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วนำไปปั่นผสมต่อด้วยเครื่องโพลีตรอน (polytron homogenizer) ใช้ความเร็วในการผสมสูงสุด 1 นาที ปรับค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายให้ได้ 3.5 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริค ซึ่งจะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยอัตราเร็ว 10,000xg นาน 60 นาที แล้วกำจัดชั้นไขมันด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ

Okada and Aikawa (1986) รายงานการสกัดเอนไซม์คาเทพซิน-ดี จากเนื้อเยื่อชั้นนอก (mantle tissue) ของหอยทะเล โดยใช้เนื้อเยื่อ 30 กรัม นำมาปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันในสารละลายบัฟเฟอร์เย็น 270 มิลลิลิตร (ที่มีโซเดียมอะซิเตต 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.0 และมี triton x-100 เข้มข้นร้อยละ 0.1 หลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายให้ได้ 5.0 โดยเติมกรดอะซิติค 1 โมลาร์ แล้วนำเข้าเครื่องเหวี่ยงแยกตะกอนออก เก็บส่วนของเหลวไว้ นำตะกอนที่แยกออกมาสกัดซ้ำในสารละลายบัฟเฟอร์เย็น 40 มิลลิลิตร หลังจากนั้นรวมของเหลวที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งไว้

Pavasovic *et al.* (2004) สกัดเอนไซม์โปรติเอสจาก midgut gland ของปูทะเลโดยนำ midgut gland ปั่นผสมด้วยสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เย็น ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 โดยใช้

อัตราส่วนระหว่างเนื้อเยื่อต่อสารละลายที่ใช้สกัดเท่ากับ 1 : 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใช้ความเร็วในการผสมสูงนาน 1 นาที จากนั้นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยอัตราเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที เก็บส่วนของเหลวที่ได้ซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส

4. การเพิ่มความบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอส

เมื่อสกัดเอนไซม์โปรติเอสออกจากเมมเบรนได้แล้ว ต้องแยกเอนไซม์ออกจากสิ่งเจือปนอื่น ๆ รวมทั้งเพิ่มความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ให้มากขึ้น เพื่อให้ได้ผลผลิตของเอนไซม์ที่มีปฏิกิริยาการทำงานสูงสุด วิธีการแยกเอนไซม์ออกจากส่วนอื่น ๆ ทำได้หลายวิธี (Price and Stevens, 1982) ดังนี้

4.1 การแยกตามขนาดของโมเลกุล แบ่งเป็น 4 แบบ คือ

4.1.1 การเหวี่ยง วิธีนี้อาศัยแรงเหวี่ยงของเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ทำให้เอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากตกตะกอนได้เร็วกว่าเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ไม่นิยมใช้แรงเหวี่ยงสูง ๆ (ultracentrifuge) เนื่องจากถ้ามีปริมาณเอนไซม์น้อยอาจเกิดการกระจัดกระจายได้

4.1.2 การกรองผ่านเจล (gel filtration) วิธีนี้อาศัยความแตกต่างระหว่างขนาดของเอนไซม์และสิ่งเจือปน วิธีนี้มักใช้ในขั้นตอนแรก ๆ ของการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์ เนื่องจากเม็ดเจลมีราคาไม่แพง

4.1.3 ไดอะไลซิสและอุลตราฟิลเตรชัน ไดอะไลซิสเป็นวิธีที่ใช้กำจัดเกลือและสารโมเลกุลเล็ก ๆ ออกจากสารละลายเอนไซม์ในระหว่างการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ โดยใช้เมมเบรนเป็นตัวเลือกผ่าน ส่วนอุลตราฟิลเตรชันเป็นวิธีการทำให้โมเลกุลเล็ก ๆ และตัวทำละลายผ่านเมมเบรนออกมาโดยการใช้ความดันช่วย โมเลกุลตัวทำละลายที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านออกจากเมมเบรนได้ จึงถูกสะสมเป็นสารละลายเข้มข้น

4.2 การแยกตามลักษณะประจุ แบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ

4.2.1 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุไฟฟ้า (ion exchange chromatography) วิธีนี้อาศัยหลักการเกิดแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic attraction) ระหว่างประจุในเอนไซม์และประจุตรงข้ามของตัวแลกเปลี่ยนไอออน ประกอบด้วยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น DEAE cellulose และ CM-cellulose ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่มีความสามารถแตกตัวให้ประจุที่ค่าความเป็นกรดเบส ต่าง ๆ การแยกเอนไซม์ออก ต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีประจุตรงข้ามกับประจุในเอนไซม์ชะล้างเอนไซม์จากตัวแลกเปลี่ยนไอออน

4.2.2 อิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis) วิธีนี้อาศัยความแตกต่างในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้าโดยอัตราการเคลื่อนที่ขึ้นกับประจุ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุล

4.2.3 ไอโซอิเลคตริกโฟกัสซิง (Iseolectric focusing) วิธีนี้ใช้ Isoelectric point (pI) ของเอนไซม์ในการแยกชนิดของเอนไซม์ นำสารละลายเอนไซม์มาแยกใน pH gradient โดยเกิดการเคลื่อนย้ายของโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้าไปยังตำแหน่งที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับค่า pI ของเอนไซม์นั้น ทำให้สามารถแยกเอนไซม์แต่ละชนิดออกจากกันได้

4.3 การแยกตามลักษณะจำเพาะของ binding site (affinity chromatography) วิธีนี้เป็นโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ โดยการเกิดดูดซับที่ผันกลับและจำเพาะระหว่างสารที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์กับสารลิแกนด์ (ligand) ที่จับอยู่กับตัวกลาง (insoluble matrix) เช่น เซฟาโรส (sepharose) ซึ่งเป็นอะกาโรสเจลที่มีหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลจับกับลิแกนด์ด้วยพันธะโควาเลนท์ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณของลิแกนด์สูง ๆ ชะเอนไซม์ที่จับกับลิแกนด์ จะสามารถแยกเอนไซม์ออกมา

4.4 การแยกโดยการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลาย แบ่งออกได้เป็น 3 แบบ

4.4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายเอนไซม์ วิธีนี้ต้องปรับค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายให้เท่ากับค่าความเป็นกรดเบสของเอนไซม์ จะทำให้เอนไซม์ตกตะกอน แล้วแยกตะกอนเอนไซม์ออกมา วิธีนี้จะทำได้เมื่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

4.4.2 การเปลี่ยนแปลงค่า ionic strength วิธีนี้ทำโดยเพิ่มสารที่มีประจุลงในสารละลายเอนไซม์ ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์เกิดการผลักกันระหว่างโมเลกุล ส่งผลให้การละลายของเอนไซม์ในสารละลายที่มีค่า ionic strength ต่ำ เพิ่มขึ้น (salting in) แต่เมื่อเพิ่มสารที่มีประจุลงในสารละลายเอนไซม์จนทำให้มีค่า ionic strength สูง การละลายของเอนไซม์จะลดลง เนื่องจากเกิดการแย่งโมเลกุลของน้ำระหว่างประจุของสารที่เติมลงไปกับตัวถูกละลายอื่น ๆ ซึ่งประจุของสารที่เติมลงไปจับโมเลกุลของน้ำได้ดีกว่า จึงทำให้เอนไซม์ละลายน้อยลงหรือตกตะกอนมากขึ้น เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า salting out นิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อตกตะกอนเอนไซม์ เนื่องจากมีราคาถูกละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ และไม่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ

4.4.3 การลดค่า dielectric constant ทำโดยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอธานอลหรืออะซิโตนลงในสารละลายเอนไซม์ ทำให้ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกของสารละลายลดลง ทำให้ความสามารถในการทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายของน้ำลดลง มีผลทำให้เพิ่มการจับกันระหว่างโมเลกุลและลดการละลายของเอนไซม์ วิธีนี้มักใช้ตกตะกอนเอนไซม์ในขั้นต้น ๆ (ซึ่งมีปริมาตรตัวอย่างมาก) แต่บางครั้งการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ โดยปกติจะทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ เพื่อลดการเสียสภาพของเอนไซม์

การเลือกวิธีเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์นั้น บางครั้งไม่จำเป็นต้องใช้ทุกวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่จะเลือกใช้เพียงบางวิธีเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์ในระดับหนึ่ง แล้วนำเอนไซม์ไปใช้ ได้มีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์โปรติเอสในเฮพาโทแพนเครียสของกุ้งและเอนไซม์โปรติเอสของปลาและปลาหมึกดังนี้

Hernandez-Cortes *et al.* (1997) รายงานการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงเอนไซม์แห้งที่เตรียมมาจากเฮพาโทแพนเครียสของกุ้งขาวแวนนาไม โดยละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟต 20 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบส 7 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ ไดอะไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ นาน 8 ชั่วโมง แล้วผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเจล Q-Sepharose ซึ่งอิ่มตัวด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟต 20 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ ชะคอลัมน์โดยค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ จาก 0.2 ถึง 0.6 โมลาร์ ควบคุมอุณหภูมิคงที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริพซินรวมกัน ทำให้เข้มข้นโดยกรองผ่านเมมเบรน นำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเจล phenylsepharose ที่อิ่มตัวด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.5 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 โมลาร์ หลังจาก

นั้นเอนไซม์ไคโมทริพซินถูกชะออกมา โดยการเติมเอธิลีนไกลคอล แล้วลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตลง เก็บส่วนนี้ไว้ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 56 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น ในขณะที่ผ่านเจลครั้งแรกมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 10 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น

Jiang *et al.* (1991) เพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของกุ้งกุลาดำ โดยเริ่มจากการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 20-80 เข้าเครื่องเหวี่ยงอัตราเร็ว 10,000xg นาน 30 นาที เก็บส่วนตะกอนมาละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ให้ได้ปริมาตรน้อยที่สุด ไดอะไลซ์ข้ามคืนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพิ่มความบริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-75 คอลัมน์ขนาด 2.6 x 85 เซนติเมตร ชะล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 อัตราเร็ว 0.3 มิลลิลิตร/นาที เลือกเก็บสะสมส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงได้ 2 ส่วน คือ ส่วนแรกมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น ในขณะที่ส่วนที่สองมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 11.1 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น แล้วนำแต่ละส่วนมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการผ่านเมมเบรน บรรจุในคอลัมน์ของ TSK DEAE-650 ขนาด 2.6x30 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย ทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ แล้วชะล้างเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8.0 จาก 0.1 เป็น 0.2 โมลาร์ อัตราเร็วในการชะเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตร/นาที แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ซ้ำแต่จะชะล้างเอนไซม์ออกจากคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 จาก 0.1 ถึง 1.0 โมลาร์ เลือกเก็บสะสมส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงได้ 4 ส่วน ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นในแต่ละส่วนที่เก็บไว้ดังนี้ คือ 10.25, 3.41, 1.73 และ 11.5 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น ตามลำดับ

Garcia-Carreno and Haard (1994) รายงานเกี่ยวกับการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสของเฮพาโทแพนเครียสจากกุ้ง โดย affinity chromatography แยกส่วนระหว่าง exopeptidase และ endopeptidase นำสารละลายเอนไซม์ 1.5 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ Agarose ร้อยละ 4 ในสารละลายทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร พักไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ชะล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เก็บส่วนที่ออกจากคอลัมน์คือ exopeptidase คงเหลือกิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ 7 ต่อจากนั้นชะล้าง

ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 0.1 โมลาร์ 20 มิลลิลิตร เก็บส่วนที่ออกจากคอลัมน์คือ endopeptidase เหลือกิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ 45 เมื่อใช้ 0.02 มิลลิโมลาร์ของ succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (SAPNA) เป็นสับสเตรท

Gate and Travis (1973) รายงานว่าเฮพาโทแพนเครียสจากหัวกุ้งแช่แข็ง 5 กรัม นำมาสกัดด้วยสารละลายโซเดียมบอเรตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 ปริมาตร 35 มิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เข้าเครื่องเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยอัตราเร็ว 7,970xg นาน 20 นาที สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์โดย Sephadex G-75 ขนาดของคอลัมน์ 4.6x60 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 แล้วเก็บส่วนที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงไว้สองส่วน คือ คาร์บอกซีเปปติเดส–เอ ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 7 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น มีผลได้ของเอนไซม์ร้อยละ 97 และคาร์บอกซีเปปติเดส–บี มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 7.7 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น มีผลได้ของเอนไซม์ 100 % นอกจากนี้ยังเพิ่มความบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ของ DEAE-Sephadex A50 ขนาด 1.9x11 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย ทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.4 โมลาร์ แล้วเก็บส่วนที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงไว้ พบว่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส–เอ เพิ่มขึ้นเป็น 7.3 เท่า และมีกิจกรรมเอนไซม์เหลือร้อยละ 56 สำหรับเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส–บี มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 11.9 เท่า และมีผลได้ของเอนไซม์ร้อยละ 86 แล้วเพิ่มความบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ของ DEAE-Sephadex A 50 ซ้ำอีกครั้ง แต่ชะล้างคอลัมน์ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.15, 0.2, 0.25 และ 0.3 โมลาร์ ตามลำดับ ทำให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส–เอ เพิ่มขึ้นเป็น 32.3 เท่า มีผลได้ของเอนไซม์ร้อยละ 56 สำหรับเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส–บี มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 33.8 เท่า และมีผลได้ของเอนไซม์ร้อยละ 75

Hameed and Haard (1985) รายงานการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์คาเทพซิน-ซี จากเฮพาโทแพนเครียสของหมึก โดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยอัตราเร็ว 10,000xg นาน 60 นาที นำส่วนของเหลวกลับมาตกตะกอนซ้ำด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ร้อยละ 70 ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง แยกเก็บตะกอนเอนไซม์โดยเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยอัตราเร็วเดิม แล้วละลายตะกอนเอนไซม์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 154 มิลลิ-

โมลาร์ ในปริมาตรน้อยที่สุด หลังจากนั้นผ่านขั้นตอนไดอะไลซิส นาน 12-18 ชั่วโมง แล้วปรับค่าความเป็นกรดเบส ของสารละลายเอนไซม์ในถุงไดอะไลซ์เป็น 5.0 กำจัดตะกอนออกด้วยอัตราเร็วของเครื่องเหวี่ยง 20,000xg นาน 15 นาที เก็บส่วนของเหลวไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง แล้วกำจัดตะกอนออกโดยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 3,000xg นาน 15 นาที เก็บส่วนของเหลวมาทำให้เข้มข้นโดยผ่านเมมเบรนอุลตราฟิลเตรชั่น ภายใต้ความดันไนโตรเจน 40 ปอนด์/ตารางนิ้ว ต่อมาไดอะไลซ์ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟต ที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 1,000 เท่าของสารละลายเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น 10 เท่า โดยกรองผ่านเมมเบรน หลังจากนั้นนำมาเพิ่มความบริสุทธิ์โดย affinity chromatography ผ่านคอลัมน์ขนาด 5x80 มิลลิลิตรที่บรรจุด้วย PCMB Sepharose ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 แล้วชะล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตต 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.5 จนกระทั่งไม่มีโปรตีนออกมา และคาเทพซินถูกชะออกมาด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.8 ที่มี mercaptoethylamine 20 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 36 เท่า ของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น

Okada and Aikawa (1986) รายงานว่าเอนไซม์คาเทพซิน-ดี ที่สกัดจากเนื้อเยื่อชั้นนอกของหอย มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด 37.7 ยูนิต หลังจากนำเอนไซม์มาเพิ่มความบริสุทธิ์โดยมีขั้นตอนดังนี้ ใช้เอนไซม์ 320 มิลลิลิตร ทำให้เข้มข้นโดยกรองผ่านเมมเบรน เหลือปริมาตรประมาณ 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเอนไซม์เข้มข้นผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 คอลัมน์ที่ใช้มีขนาด 4.4x72 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ใช้อัตราการไหล 10 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แล้วเก็บสารละลายเอนไซม์เป็นส่วน ๆ เลือกเก็บส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงไว้ พบว่าเอนไซม์คาเทพซิน-ดี ที่ผ่านคอลัมน์จะมีความบริสุทธิ์เป็น 15.6 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ 25.8 หน่วย นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์มากยิ่งขึ้นโดยนำเอนไซม์ที่ผ่านเจลฟิลเตรชันแล้ว มาไดอะไลซ์ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5 ปริมาตร 2 ลิตร แช่นาน 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม CM-52 slurry ลงในสารละลายเอนไซม์คนเบา ๆ นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงบรรจุลงคอลัมน์ขนาด 2.4x10 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม 400 มิลลิลิตร ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0 ถึง 300 มิลลิโมลาร์ ใช้อัตราการไหล 10 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แยกเก็บสารละลายเอนไซม์เป็นส่วน ๆ โดยเลือกเก็บส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงไว้ พบว่าการเพิ่ม

ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์คาเทพซิน-ดี โดยคอลัมน์ ion exchange CM-52 จะมีความบริสุทธิ์เป็น 43.1 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือ 15.1 หน่วย

Reece (1988) ศึกษาการแยกเอนไซม์ acidic protease และ alkaline protease โดยนำของเหลวที่สกัดได้จากการหมักไส้พุงปลา (viscera silage) มากรองผ่าน glass wool และกระดาษกรอง Whatman 541 เติมสารละลาย polyacrylic acid ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงในของเหลวที่กรองได้ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนนาน 30 นาที หลังจากนั้นกำจัดตะกอนโดยเข้าเครื่องเหวี่ยง อัตราเร็ว 7000xg นาน 10 นาที ค่อย ๆ รินส่วนของเหลวออกมา ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้ได้ 3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 2 โมลาร์ ทำให้เกิดการตกตะกอน แล้วนำเข้าเครื่องเหวี่ยง แยกเก็บส่วนของเหลวออกมา ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยอุลตราฟิลเตรชัน ซึ่งสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่เตรียมได้ คือ acidic protease สำหรับตะกอนที่แยกออกมาละลายในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.4 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8.5 และเติมแคลเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ลงในสารละลายเอนไซม์จนกระทั่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดเพื่อละลายตะกอนจนหมด ซึ่งสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้คือ alkaline protease ไดอะไลซ์ข้ามคืนในสารละลายบัฟเฟอร์เดิม หลังจากนั้นนำเอนไซม์ acidic protease และ alkaline protease มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 38.0 และ 38.7 หน่วยตามลำดับ นำเอนไซม์ acidic protease มาเพิ่มความบริสุทธิ์โดยใช้ขั้นตอนดังนี้ นำเอนไซม์ acidic protease มาปรับค่าความเป็นกรดเบสให้ได้ 5 ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5 แล้วกำจัดตะกอนออกโดยเข้าเครื่องเหวี่ยง นำสารละลายเอนไซม์ผ่านคอลัมน์ซึ่งบรรจุ Whatman DE-52 ion exchange cellulose 2.5 ลิตร ในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ซึ่งอิ่มตัวด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5 ที่มี mercaptoethanol 1 มิลลิโมลาร์ และ benzalkonium chloride เข้มข้นร้อยละ 0.01 แล้วชะ unbound protein ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 1.5 ลิตร ชะโปรติเอส ออกมาด้วยกรดอะซิติค 0.2 โมลาร์ หลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายเอนไซม์เป็น 4 ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.58 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4 นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเก็บไว้ สำหรับเอนไซม์ alkaline protease จะเพิ่มความบริสุทธิ์ได้โดยนำสารละลายเอนไซม์ alkaline protease ผ่านคอลัมน์ซึ่งบรรจุ Whatman DE-52 ion exchange cellulose ซึ่งอิ่มตัวด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.8 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเก็บไว้ การเพิ่มความบริสุทธิ์ของ acidic protease และ alkaline protease โดยผ่าน

คอลัมน์ Whatman DE-52 ion exchange ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เหลือ 15.6 และ 13.5 หน่วย ตามลำดับ

5. สมบัติของเอนไซม์โปรติเอส

การที่เอนไซม์โปรติเอสมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและการอ่อนตัวของกล้ามเนื้อสัตว์น้ำภายหลังการตาย ส่งผลให้สัตว์น้ำเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อสัมผัส และเสื่อมคุณภาพลง (Jiang, 2000) ดังนั้นหากต้องการชะลอการเปลี่ยนแปลงจึงควรทราบสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล ค่าความเป็นกรดเบส และอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ แล้วนำสมบัติของเอนไซม์ดังกล่าวมาประยุกต์ เพื่อทำให้ผลผลิตสูงขึ้น ตัวอย่างการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสในสัตว์น้ำที่มีผู้ทำการศึกษามาแล้ว มีดังนี้

Iwata *et al.* (1974) สรุปว่า alkaline protease ในกล้ามเนื้อของ white croake และ baracuda มีน้ำหนักโมเลกุล 500-800 กิโลดาลตัน ทนต่อความร้อน และที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียสจะช่วยเร่งการทำงานของเอนไซม์นี้ นอกจากนี้ ค่าความเป็นกรดเบส ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 8 เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท

Garcia-Carreno and Haard (1993) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก langostilla (*Plueroncodes planipes*) และ crayfish (*Pacifastacus astacus*) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14,000 -81,000 ดาลตัน และค่าความเป็นกรดเบส ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์อยู่ในช่วง 5-8 และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6 และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิของสารละลายเอนไซม์สูงถึง 70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์เหลือเพียงร้อยละ 20

Hernandez-Cortes *et al.* (1997) รายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคโมทริพซินจากเฮพาโทแพนเครียสของกุ้งเท่ากับ 25 กิโลดาลตัน และโปรติเอสจากครัสตาเซียนมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงในสภาวะเป็นด่างคล้ายกับเอนไซม์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งจะทนต่อสภาวะเป็นเบสดีกว่าที่สภาวะเป็นกรด

Garcia-Carreno *et al.* (1994) รายงานว่าเอนไซม์ไคโมทริพซินจากเฮพาโทแพนเครียสของกุ้ง มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14 ถึง 100 กิโลดาลตัน ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการบ่มเอนไซม์นาน 15 นาที นอกจากนี้กิจกรรมเอนไซม์จะถูกทำลายไปร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดจะถูกทำลายที่ 70 องศาเซลเซียส ในขณะที่คอลลาจีเนสจะถูกเร่งกิจกรรมเอนไซม์เล็กน้อยที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรภายหลังจากการบ่มเอนไซม์นาน 60 นาที แต่กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

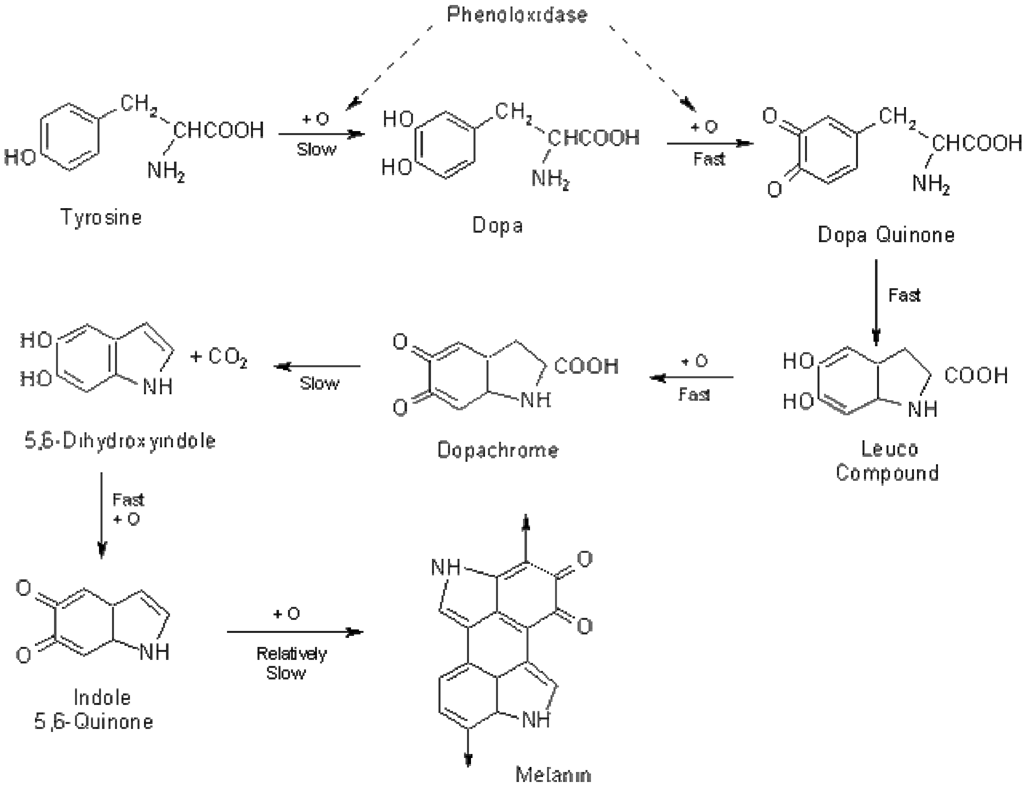
Teschke and Saborowski (2005) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก midgut gland ของ *Cragon crangon* และ *Cragon allmani* มีค่าความเป็นกรดเบส ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์อยู่ในช่วง 5-7 และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.5-6 และ 6.5-7 ตามลำดับ

การเกิดสีน้ำตาลในสัตว์น้ำ

การเกิดสีน้ำตาล (browning) เป็นการเสื่อมเสียที่สำคัญของสัตว์น้ำที่มีเปลือกนอกเหนือจากการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ การเกิดสีน้ำตาลมักเกิดจากเอนไซม์ (enzymatic browning) ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยากันระหว่างองค์ประกอบ 3 ชนิดคือ ออกซิเจน เอนไซม์และสับสเตรท ถ้าขาดปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยา (Heimann, 1980) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยานี้ คือ โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase, PPO) (McEvily *et al.*, 1991) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์มีลักษณะเป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (Martinez and Whitaker, 1995) มีชื่อเรียกตามสับเสตรท เช่น ไทโรซิเนส (tyrosinase) แคเทโคเลส (catecholase) ครีโซเลส (cresolase) โพลีฟีนอลเลส (polyphenolase) ฟีนอลเลส (phenolase) ไดฟีนอลเลส (diphenolase) และแคเทคอลออกซิเดส (catechol oxidase) (Whitaker, 1995) ความเข้าใจในรายละเอียดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปตามความต้องการได้

สับสเตรทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสคือ สารประกอบฟีนอลลิกชนิดต่าง ๆ เช่น catechins, cinnamic acid ester, chlorogenic acid, 3,4-diphenylalanine และ tyrosine (Zawistowski *et al.*, 1991) ในปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะเร่งการเกิดปฏิกิริยา 2 แบบ คือ ปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ให้สารประกอบโมโนฟีนอล ได้เป็นสารออโท-ไดฟีนอล (*O*-Diphenols) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น (dehydrogenation) ต่อไป ได้เป็น

ออโท-ควิโนน (*O*-quinones) สารควิโนนที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนแปลงและทำปฏิกิริยาต่อไปกับสารประกอบฟีนอล กรดอะมิโน และสารอื่นๆ โดยไม่ใช้เอนไซม์ โดยให้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ เมลานิน (melanin) ซึ่งเป็นสารสีน้ำตาลดำ ดังภาพที่ 5 ซึ่งผลของปฏิกิริยาทำให้อาหารมีการเปลี่ยนแปลงด้านลักษณะปรากฏและลักษณะเนื้อสัมผัส ซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Winkler and Lerch, 1981; Kim *et al*., 2000)



ภาพที่ 5 การเกิด melanin จาก tyrosine

ที่มา: Lerner (1953)

1. การยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล

โดยทั่วไปการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลเนื่องจากเอนไซม์ คือ การกำจัดออกซิเจนและการชะงักการทำงานของเอนไซม์ โดยการใช้ความร้อนหรือสารเคมี

1.1 การกำจัดออกซิเจน

วิธีการโดยทั่วไปคือ การทำให้เกิดสุญญากาศหรือใช้แก๊สเฉื่อย (Heimann, 1980) และการลดออกซิเจน โดยการบรรจุในสภาพดัดแปลงบรรยากาศ

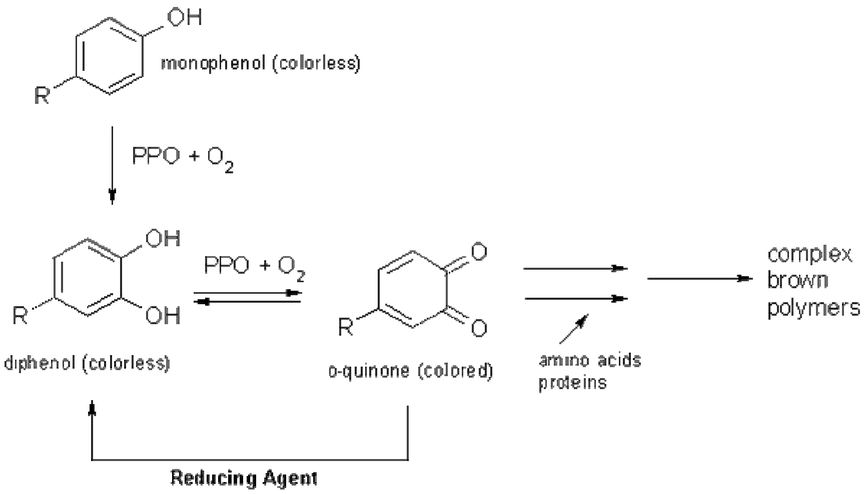
1.2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทำได้โดยการใช้ความร้อนหรือสารเคมี การใช้ความร้อนในบางกรณีอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพและลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหาร (McEvily *et al.*, 1991) วิธีการที่ใช้กันแพร่หลายคือการใช้สารเคมีดังนี้

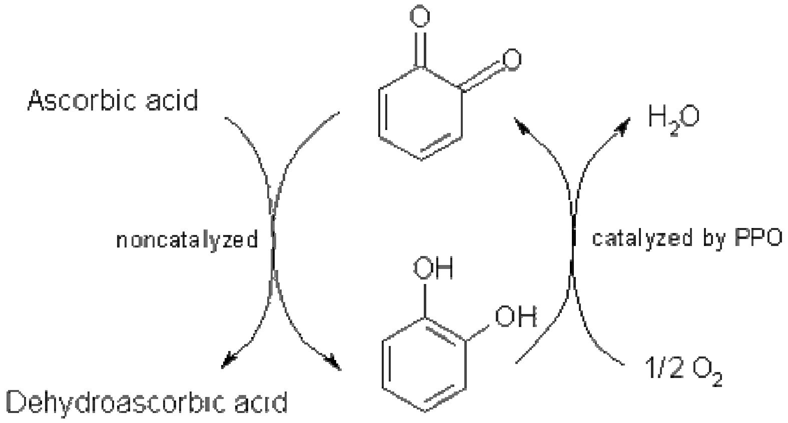
1.2.1 กลุ่มซัลไฟต์ (sulfiting agents) เป็นสารที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีผลยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลทั้งจากปฏิกิริยาที่ใช้และไม่ใช้เอนไซม์ รวมทั้งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ ดังแสดงในภาพที่ 6 แต่ในปัจจุบันพบว่า สารดังกล่าวก่อให้เกิดอันตรายในคนที่เป็นโรคหอบหืดที่เกี่ยวข้องกับสเตียรอยด์เป็นผลให้มีการประกาศห้ามใช้ซัลไฟต์ในผลิตภัณฑ์ที่ต้องบริโภคสดในสหรัฐอเมริกา (Davidson and Juneja, 1990)

1.2.2 สารที่มีสมบัติในการจับโลหะ (chelating agents) สารเคมีที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ โทรโพโลน (tropolone) เอไซด์ (azide) โซเดียมไดเอทธิลไดไทโอคาร์บาเมต (sodium diethyl dithiocarbarmate) และเอทธีลีนไดเอมีน เตตระแอซีติคแอซิด (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) เพื่อกำจัดทองแดงออกไป

1.2.3 กรดแอสคอร์บิกและอนุพันธ์ โดยกรดสามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้ 2 วิธี คือ การเกิดปฏิกิริยากับควิโนน ซึ่งกรดแอสคอร์บิกจะรีดิวซ์ควิโนนให้ไปเป็นฟีนอลตามเดิมก่อน จากนั้น ควิโนนจะทำปฏิกิริยาต่อไปเป็นสารสีน้ำตาล (Zawistowski *et al.*, 1991) ดังแสดงในภาพที่ 7 และยับยั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยผ่านทางการเกิดอนุมูลอิสระไปปิดบริเวณ active site ของเอนไซม์ (Hsu *et al.*, 1988; Zawistowski *et al.*, 1991,)



ภาพที่ 6 กลไกของสารเคมีกลุ่มซัลไฟต์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส
ที่มา: Marshall *et. al*. (2000)



ภาพที่ 7 กลไกของกรดแอสคอร์บิกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส
ที่มา: Marshall *et al*. (2000)

นอกจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จะมีผลทำให้เกิดสีน้ำตาลแล้ว ยังมีบทบาทในเรื่องการสร้างและการแข็งตัวของเปลือกในกระบวนการลอกคราบของสัตว์น้ำมีเปลือกด้วย โดยในระหว่างกระบวนการแข็งตัวของเปลือก ไดฟีนอลถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้กลายเป็นควิโนน ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อไปกับกรดอะมิโน ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันเกิดการสร้างเปลือกแข็งขึ้นมาได้

Travis (1954) ได้ศึกษาปริมาณเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในแต่ละระยะของการลอกคราบในกุ้ง spiny lobster (*Panulirus argus Latreille*) พบว่า การลอกคราบแต่ละระยะมีปริมาณโพลีฟีนอลออกซิเดสต่างกันโดยในระยะ postmolt นั้น บริเวณคิวติเคิล (cuticle) จะบางเหลือเฉพาะอิพิเดอร์มิส (epidermis) เปลือกมีการพัฒนามากขึ้น มีปริมาณโพลีฟีนอลออกซิเดสต่ำมาก ในระยะ intermolt พบว่ามีการพัฒนาคิวติเคิลขึ้นมาใหม่ ส่วนในระยะ early premolt และ late premolt นั้น เปลือกจะมีความสมบูรณ์มากขึ้นและสมบูรณ์มากที่สุดในระยะ late premolt ซึ่งเปลือกเก่าพร้อมที่จะหลุดออก โดยทั้งระยะ early premolt และ late premolt นั้น มีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด โดยปริมาณของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสนั้นจะเกี่ยวข้องกับปริมาณควิโนนในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ ซึ่งการมีควิโนนปริมาณมากในช่วง late premolt ช่วยป้องกันจุลินทรีย์ที่จะเข้าไปยับยั้งการสร้างคิวติเคิลได้ เนื่องจากในระยะนี้กุ้งจะอ่อนแอและง่ายต่อการติดเชื้อ ประมาณ 2-3 วัน จนกว่าคิวติเคิลใหม่จะแข็งตัว

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

ปูนิ่ม (*Scylla sp.*) จากนางหงส์ฟาร์ม จังหวัดระนอง และสมศักดิ์ฟาร์ม จังหวัดตราด โดยปูที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นปูทะเล มีชีวิต ที่เพิ่งลอกคราบใหม่ ๆ และกระดองมีลักษณะเป็นเยื่อหุ้มบาง ๆ ผ่านการแช่น้ำจืดเป็นระยะเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นบรรจุปูนิ่มลงในกล่องสไตโรโฟมที่เจาะรูเพื่อให้อากาศผ่านเข้าออกได้ คลุมปูนิ่มด้วยผ้าขนหนูชุบน้ำ สำหรับปูนิ่มจากจังหวัดระนองจะขนส่งทางเครื่องบิน ส่วนปูนิ่มจากจังหวัดตราดจะขนส่งทางรถยนต์มายังห้องปฏิบัติการภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ใช้เวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง ขนาดของปูนิ่มที่ใช้คือ ขนาด 8-10 ตัว/กิโลกรัม

2. อุปกรณ์ในการทดสอบ

2.1 ตู้อบไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิได้ (Sure chef combi-steamer MCR, USA)
2.2 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Yamato unicell model UC-100, Japan)
2.3 ห้องชิมและอุปกรณ์สำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส

3. เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Sartorius 2462, Germany)
3.2 เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Hettich zentrifugen model Universal 32 R, Germany)
3.3 เครื่องผสมอาหารในหลอดแก้ว (vortex mixer) (Vortex qenie-z model G-560E, USA)
3.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, UV-1700 CE, Japan)
3.5 เครื่องผสม (Polytron homogenizer model PT45-80, Switzerland)
3.6 เครื่องวัดสี (Minolta spectrophotometer CM-3500d, USA)

3.7 เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (TA-HD texture analyser/50, UK)

3.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert WB14, Germany)

3.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) (Metrohm 744, Switzerland)

3.10 เครื่องกวน (magnetic stirrer) (Corning stirrer model PC 220, USA)

3.11 เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (Jassco FP-777, Japan)

3.12 เครื่องปั่นผสม (blender) (Waring model 32BL80, USA)

3.13 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base nitrogen ; TVB-N) ตามวิธีของ Conway and Byrne (1936)

3.14 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ค่าความสด (K-value) ตามวิธีของ Uchiyama (1978)

3.15 เครื่องแก้วที่จำเป็นในการวิเคราะห์

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ค่า K ตามวิธีของ Uchiyama (1978)

4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ค่า TVB-N ตามวิธีของ Conway and Byrne (1936)

4.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเกลือ ตามวิธีของ FAO (1981)

4.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน ตามวิธีของ Hardy and Smith (1976)

4.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ ตามวิธีของ Yamagata and Low (1995)

4.6 สารเคมีสำหรับการสกัดเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีของ Pavasovic *et al.* (2004)

4.7 สารเคมีสำหรับการสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีของ Montero *et al.* (2001)

4.8 สารเคมีสำหรับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีของ An *et al.* (1994) โดยใช้ TCA-Lowry assay

4.9 สารเคมีสำหรับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีของ Liu *et al.* (2006)

4.10 สารเคมีสำหรับการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ Pepstatin A, EDTA, Soybean trypsin inhibitor (SBTI), phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) และ trans-epoxy-succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E 64) (Sigma, USA)

4.11 สารเคมีสำหรับการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ได้แก่ กรดซิตริก กรดแอสคอร์บิก โซเดียมเบนโซเอต โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 4 hexylresorcinol และ EDTA (Sigma, USA)

4.12 สับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC, Phe-Ala-Ala และ Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-AMC (Sigma, USA) ตามวิธีการของ Barrett and Kirschke (1981) และ Ishida *et al*. (1995)

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการบรรจุและเก็บรักษาตัวอย่าง

5.1 ถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน (polyethylene, PE) ขนาด 15 X 23 เซนติเมตร[2]

5.2 กล่องสไตโรโฟม (styrofoam) ขนาด 36 X 48 X 30 เซนติเมตร[3] ความหนา 2.54 เซนติเมตร

6. เครื่องประมวลผลข้อมูล

6.1 เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์

6.2 โปรแกรมสำเร็จรูป

วิธีการ

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปูนิ่มหลังการลอกคราบ

1.1 ศึกษาดัชนีวัดความสดของปูนิ่ม

1.1.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

นำปูนิ่มสดมาปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Waring blender) จากนั้นนำปูนิ่มบดที่ได้บรรจุใส่ถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน ปริมาณถุงละ 150 กรัม และนำมาเก็บรักษาในกล่องสไตโรโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง (น้ำแข็ง 450 กรัม/ของเหลว 150 กรัม) โดยเปลี่ยนน้ำแข็งและวิเคราะห์คุณภาพทุกวันจนกว่าปูนิ่มจะเสื่อมเสีย ซึ่งคุณภาพที่วิเคราะห์ได้แก่ ค่า K ตามวิธีของ Uchiyama (1978) ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ตามวิธีของ Conway and Byrne (1936) ปริมาณฮีสตามีนตามวิธีของ Hardy and Smith (1976) ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ ตามวิธีของ Yamagata and Low (1995) ค่าความเป็นกรดเบส และปริมาณความชื้น ตามวิธี AOAC (1995) ปริมาณเกลือตามวิธีของ FAO (1981)

1.1.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

นำปูนิ่มมาใส่ถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน และทำให้ตายทันทีโดยการใช้น้ำแข็งวางบนถุงพลาสติกที่มีปูบรรจุอยู่ นาน 10 นาที จากนั้น นำมาเก็บรักษาในกล่องสไตโรโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง (อัตราส่วนน้ำแข็ง 3 กิโลกรัม/ปู 1 กิโลกรัม) โดยเปลี่ยนน้ำแข็งและวิเคราะห์คุณภาพทุกวันจนกว่าปูนิ่มจะเสื่อมเสีย ซึ่งคุณภาพที่วิเคราะห์ได้แก่ การสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่ม (% drip loss)

1.1.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

เตรียมปูนิ่มเช่นเดียวกับการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ โดยประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของปูนิ่มสดในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น ความเป็นกระดาษ เนื้อสัมผัส และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของปูนิ่มนึ่งในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส รสชาติ วิธีการเตรียมตัวอย่างปูนิ่มนึ่งนั้นจะใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อปูมาทดสอบ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อนำปูนิ่มไปนึ่งทั้งตัวพบว่า เนื้อและเปลือกมีลักษณะแยกออกจากกัน ไม่เหมือนกับการนำปูนิ่มไปประกอบ

อาหารโดยทั่วไปซึ่งใช้วิธีการทอดหรือผัด การทดลองในครั้งนี้จึงนำเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อปูมาห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปนึ่งในตู้อบไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิได้ (Sure chef combi-steamer MCR, USA) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 10 คน ซึ่งผู้ทดสอบจะถูกฝึกฝนในการประเมินคุณลักษณะต่าง ๆ ของปูนิ่ม แล้วนำข้อมูลที่ได้มาอภิปรายเพื่อให้ผู้ทดสอบได้รับข้อมูล และเกิดความเข้าใจที่ตรงกันในแต่ละคุณลักษณะ จากนั้น จึงนำตัวอย่างปูนิ่มมาทดสอบ ใช้การทดสอบแบบ Quantitative descriptive analysis (QDA) รวมทั้งประเมินความชอบ (9 Point hedonic scale โดย 9 = ชอบมากที่สุด และ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด) ของปูนิ่มสดในด้านลักษณะปรากฏ สีกระดอง สีเปลือกด้านท้อง กลิ่น เนื้อสัมผัส ความชอบรวมและประเมินความชอบปูนิ่มนึ่งในด้านลักษณะปรากฏ สีเนื้อปู กลิ่น เนื้อสัมผัส รสชาติ ความชอบรวม

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพทำการทดลอง 3 ซ้ำ ออกแบบการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) ส่วนการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัสทำการทดลอง 2 ซ้ำ ออกแบบการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองโดยวิธี DMRT (Duncan’s Multiple Range Test) รวมทั้งนำค่าทางเคมีและค่าคะแนนความชอบรวมมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient: r^2) เพื่อหาดัชนีที่ใช้วัดความสดของปูนิ่มที่ดีที่สุด

1.2 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาปูนิ่มก่อนการแปรรูป

นำปูนิ่มมาใส่ถุงพลาสติกโพลีเอทิลีนและทำให้ตายทันทีโดยการใช้น้ำแข็งวางบนถุงพลาสติกที่มีปูบรรจุอยู่ เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาเก็บรักษา 3 วิธี คือ

1.2.1 แช่น้ำแข็ง (น้ำแข็ง 3 กิโลกรัม/ปู 1 กิโลกรัม) อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

1.2.2 แช่น้ำแข็งผสมน้ำ (อัตราส่วนน้ำแข็งต่อน้ำ คือ 3:1 และใช้น้ำแข็งผสมน้ำ 3 กิโลกรัม/ปู 1 กิโลกรัม) อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

1.2.3 แช่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เปลี่ยนน้ำแข็งและวิเคราะห์คุณภาพทุกวันจนกว่าปูนิ่มจะเสื่อมเสีย โดยคุณภาพทางเคมีนั้นจะใช้ดัชนีวัดความสดของปูนิ่มที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 1.1 รวมถึงวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดเบสและปริมาณความชื้นตามวิธี AOAC (1995) วิธีวิเคราะห์และการเตรียมตัวอย่าง

สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและคุณภาพทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับข้อ 1.1.2 และ 1.1.3 ตามลำดับ โดยประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งตามแบบหลักเกณฑ์การให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพความสดที่ได้จากข้อ 1.1.3 รวมทั้งประเมินความชอบของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งด้วย

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพทำการทดลอง 3 ซ้ำ ออกแบบการทดลองแบบ Split plot in CRDส่วนการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัสทำการทดลอง 2 ซ้ำ ออกแบบการทดลองแบบ Split plot in RCBD โดยมีสภาวะการเก็บเป็น main plot และอายุการเก็บเป็น sub plot นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test เพื่อหาสภาวะการเก็บรักษาปูนิ่มก่อนการแช่เยือกแข็งที่ดีที่สุด

2. การศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลออกซิเดส ในปูนิ่ม

เตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆของปูนิ่ม ได้แก่ ปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว เนื้อส่วนก้ามและเฮพาโทแพนเครียส โดยนำเนื้อเยื่อดังกล่าวมาปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมแยกส่วนกัน จากนั้นนำของเหลวที่ได้แต่ละส่วนมาทำให้เป็นผง โดยใช้ไนโตรเจนเหลว และบรรจุภายใต้สภาวะสุญญากาศ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งผงปูนิ่มที่ได้จะนำไปสกัด crude enzyme สำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส และโพลีฟีนอลออกซิเดสต่อไป

2.1 ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอส

สกัด crude enzyme โดยปั่นผสมผงปูนิ่ม 1 กรัม กับสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องผสม (Polytron homogenizer model PT45-80, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นนำมา เข้าเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Hettich zentrifugen model Universal 32 R, Germany) ที่อัตราเร็ว 10,000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสเป็น crude enzyme สำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสต่อไป (ดัดแปลงจาก Pavasovic *et al.,* 2004)

2.1.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

เจือจาง crude enzyme ที่สกัดจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของปูนิ่มให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 บ่มเอนไซม์กับสับสเตรท(สารละลายเคซีน ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันหลายระดับ (0-75 องศาเซลเซียส) นาน 30 นาทีและนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้ Lowry assay (An *et al.*, 1994) ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้ แสดงเป็น ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน

2.1.2 ศึกษาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

เจือจาง crude enzyme ที่สกัดจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของปูนิ่มให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ใช้เคซีนละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ค่าความเป็นกรดเบสต่าง ๆ กันเป็นสับสเตรท โดยค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3-8 ใช้ สารละลาย MacIlvain's buffer และค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8.5-10 ใช้สารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.1.3 ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

เจือจาง crude enzyme ที่สกัดจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของปูนิ่มให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 และเติมสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Pepstatin A 1 ไมโครโมลาร์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์, SBTI 0.01 มิลลิโมลาร์, PMSF 1 มิลลิโมลาร์ และ E 64 10 ไมโครโมลาร์ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.1.4 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มต่อสับสเตรท

ผสม crude enzyme ที่สกัดจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของปูนิ่มที่เจือจาง ให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วยสารละลาย Brij 35 ร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับสับสเตรทที่ละลายอยู่ใน DMSO 1 หรือ10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยสับสเตรทที่ใช้ ได้แก่ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC, Phe-Ala-Ala และ. Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-AMC แล้วเติม สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริค 0.2 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารหยุดปฏิกิริยา (เมทานอล: บิวทานอล: น้ำกลั่นปราศจากอิออน = 35:30:35 (ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร)) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที วัดค่าความเข้มของการเรืองแสงของสาร 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) ที่ถูกปลดปล่อยจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (Jassco FP-777, Japan) ที่ค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation) 380 นาโนเมตร และ ค่าความยาวคลื่นการปล่อยพลังงาน (emission) 460 นาโนเมตร ซึ่งค่า specific activity ที่ได้ แสดงเป็น ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน (Barrett and Kirschke, 1981; Ishida *et al.*, 1995)

2.2 ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในปูนิ่ม

สกัด crude enzyme โดย นำผงของเนื้อเยื่อปูนิ่มส่วนต่าง ๆ 10 กรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.2 ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ และ Brij 35 ร้อยละ 0.2 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกวน (Corning stirrer model PC220, USA) ภายใต้สภาวะไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่อัตราเร็ว 8,000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำเฉพาะส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีน โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0-40 ภายใต้สภาวะไนโตรเจน นำไปเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 12,500xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บเฉพาะตะกอน (pellet) มาละลายด้วย สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.5 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำมากำจัดเกลือ ด้วย PD-10 column, Sephadex G-25 M ที่ 4 องศาเซลเซียส ชะล้างคอลัมน์โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดเบส 6.5 ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ของเหลวที่ได้ นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ทันทีและใช้เป็น crude enzyme สำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสต่อไป (Montero *et al.*, 2001)

2.2.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

ทำการทดลองตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Liu *et al.* (2006) โดยผสม crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลายสับสเตรท (DL-DOPA 15 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (0- 65 องศาเซลเซียส) นาน 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นเย็น ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร (Shimadzu UV-1700 CE, Japan) ทุก ๆ 1 นาที นาน 5 นาที ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส คำนวณได้จากส่วนที่เป็นกราฟเส้นตรง โดยกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 1 ยูนิต หมายถึง อัตราการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.001 ต่อนาที

2.2.2 ศึกษาความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

ทำการทดลองตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1โดยใช้สารละลายสับสเตรทที่มีค่าความเป็นกรดเบส หลายระดับ (4-9) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เช่นเดียวกับข้อ 2.2.1

2.2.3 การยับยั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

ทำการทดลองตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Liu *et al.* (2006) โดยผสม crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร กับสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สารยับยั้งได้แก่ กรดซิตริก 5 มิลลิโมลาร์, กรดแอสคอร์บิก 5 มิลลิโมลาร์, โซเดียมเบนโซเอต 5 มิลลิโมลาร์, โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 5 มิลลิโมลาร์, 4 hexylresorcinol 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน15 นาที จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรทที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 ปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เช่นเดียวกับข้อ 2.2.1

3. ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารเคมีในการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลออกซิเดสในปูนิ่มที่เก็บรักษาโดยใช้น้ำแข็ง

3.1 การทดลองหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแช่ปูนิ่ม

นำปูนิ่มหลังลอกคราบใหม่ ๆ กระดองมีลักษณะเป็นเยื่อหุ้มบาง ๆ มาใส่ในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน ทำให้ตายทันทีโดยการใช้น้ำแข็งวางบนถุงพลาสติกที่มีปูบรรจุอยู่ นาน 10 นาที จากนั้นนำปูนิ่มจุ่มลงในสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 20, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยเปรียบเทียบกับการแช่น้ำเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำขึ้นมาสะเด็ดน้ำนาน 5 นาที นำปูนิ่มบรรจุใส่ถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน จากนั้นนำมาเก็บรักษาในกล่องสไตโรโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง (อัตราส่วนน้ำแข็ง 3 กิโลกรัม/ปู 1 กิโลกรัม) โดยเปลี่ยนน้ำแข็งและวิเคราะห์คุณภาพทุกวันจนกว่าปูนิ่มจะเสื่อมเสีย

3.1.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางคมี

นำปูนิ่มสดมาปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม จากนั้นนำปูนิ่มบดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ตามวิธีของ Conway and Byrne (1936) และวัดค่าความเป็นกรดเบส ตามวิธี AOAC (1995)

3.1.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

คุณภาพที่วิเคราะห์ได้แก่ การสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่ม ค่าเนื้อสัมผัสของเนื้อปูนิ่มสุก (TA-HD texture analyzer, UK) และ ค่าสีของตัวปูนิ่มดิบ รวมถึงค่าสีของเนื้อปูนิ่มสุก (Minolta spectrophotometer CM-3500d, USA) วิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อปูนิ่มสุก เช่นเดียวกับข้อ 1.1.3 แล้วจึงนำไปวิเคราะห์คุณภาพ สำหรับการวัดค่าสีของตัวปูนิ่มดิบนั้นจะวัดบริเวณกึ่งกลางกระดอง

3.1.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

วิธีวิเคราะห์และการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับข้อ 1.1.3 โดยประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งตามแบบหลักเกณฑ์การให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพความสดที่ได้จากข้อ 1.1.3 รวมทั้งประเมินความชอบของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งด้วย

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพทำการทดลอง 3 ซ้ำ ออกแบบการทดลองแบบ Split plot in CRD ส่วนการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัสทำการทดลอง 2 ซ้ำ ออกแบบการทดลองแบบ Split plot in RCBD โดยมีความเข้มข้นของ EDTA เป็น main plot และอายุการเก็บเป็น sub plot นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองโดยวิธี DMRT เพื่อหาความเข้มข้นของ EDTAในการจุ่มปูนิ่มที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลออกซิเดสได้ดีที่สุด เพื่อจะนำมาศึกษาร่วมกับการใช้สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ในข้อ 3.2 ต่อไป

3.2 การทดลองใช้สารละลายผสมที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแช่ปูนิ่ม

นำตัวอย่างปูนิ่มเช่นเดียวกับข้อ 3.1 จุ่มลงในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์และสารละลายผสมระหว่าง EDTA 40 มิลลิโมลาร์ กับโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เปรียบเทียบกับการแช่น้ำเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำขึ้นมาสะเด็ดน้ำนาน 5 นาที บรรจุปูนิ่มในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน จากนั้นนำมาเก็บรักษาในกล่องสไตโรโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง (อัตราส่วนน้ำแข็ง 3 กิโลกรัม/ปู 1 กิโลกรัม) โดยเปลี่ยนน้ำแข็งและวิเคราะห์คุณภาพทุกวันจนกว่าปูนิ่มจะเสื่อมเสีย

การวิเคราะห์คุณภาพและการออกแบบการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองโดยวิธี DMRT เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายผสมในการจุ่มปูนิ่มที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลออกซิเดสได้ดีที่สุด

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปูนิ่มหลังการลอกคราบ

1.1 ศึกษาดัชนีวัดความสดของปูนิ่ม

1.1.1 คุณภาพทางเคมี

ค่า K (K- value)

จากการทดลองพบว่าค่า K มีปริมาณสูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น (ภาพที่ 8) และค่า K ที่วัดได้ในแต่ละวันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเริ่มต้นวันแรกที่ร้อยละ 16.00 จนกระทั่งถึงร้อยละ 85.13 ในวันที่ 7 เนื่องจากค่า K เป็นดัชนีที่บ่งบอกความสดของสัตว์น้ำได้ โดยคำนวณปริมาณอินโนซีน และไฮโปแซนทีนต่อปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Saito *et al.*, 1959) ซึ่งเมื่อสัตว์น้ำตายการสลายตัวของ ATP จะเกิดขึ้น และเมื่อเก็บรักษานานขึ้นยิ่งส่งผลให้ ATP มีการสลายตัวสูงขึ้น ส่งผลให้ค่า K สูงขึ้นด้วย โดยภายหลังการตายทันทีของสัตว์น้ำ ค่า K ควรมีค่าใกล้เคียง 0 สัตว์น้ำที่คุณภาพปานกลางมีค่า K เท่ากับร้อยละ 10-20 ส่วนสัตว์น้ำที่ไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมีค่า K มากกว่าร้อยละ 60 (สุทธวัฒน์, 2548) รูปแบบและอัตราการสลายตัวของนิวคลีโอไทด์ของสัตว์น้ำมีความแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของสัตว์น้ำ อวัยวะ ความเครียด ฤดูกาล และวิธีการเก็บรักษา (Erikson *et al*., 1997; Vazquez-Ortiz *et al*., 1997) การศึกษาของ Ozogul *et al*. (2004) พบว่าผู้บริโภคจะไม่ยอมรับปลาซาร์ดีน (*Sardina pilchardus*) ที่บรรจุในสภาพปรับบรรยากาศและสภาพสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หากมีค่า K สูงกว่าร้อยละ 80 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ขณะที่ระดับค่า K ในปลา sea bream (*Sparus aurata*) ที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ คือมากกว่าร้อยละ 40 (Alasalvar *et al*., 2002)

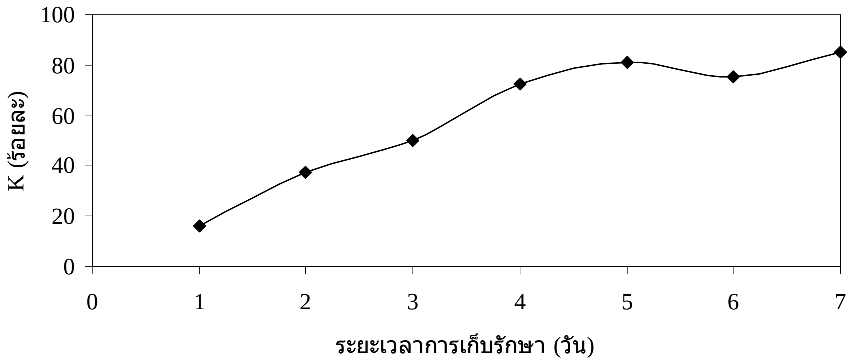
ค่า TVB-N

ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) ที่ได้จากการทดลองนี้ พบว่าค่า TVB-N สูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น (ภาพที่ 9) และค่า TVB-N ที่วัดได้ในแต่ละวันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเริ่มต้นวันแรกที่ 7.36 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม จนกระทั่งถึง 13.53 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม ในวันที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจนภายหลังการตายของสัตว์น้ำสามารถติดตามโดยการตรวจสอบปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยไตรเมธิลเอมีนและแอมโมเนีย ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนไซม์ในสัตว์น้ำหรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (สุทธวัฒน์, 2548; Fraser and Sumar, 1998) การศึกษาโดย Rahman *et al.* (2001) พบว่า ในช่วงแรกของการเก็บรักษากุ้งกุลาดำในน้ำแข็งมีค่า TVB-N เท่ากับ 5.88 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองครั้งนี้ และยังพบว่าค่า TVB-N จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา จนกระทั่งถึง 13.53 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม ซึ่งเป็นระดับที่ผู้ทดสอบไม่ยอมรับ ในช่วงเดียวกับระดับ TVB-N ในปลา European eel (*Anguilla anguilla*) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 3 ± 1 องศาเซลเซียส คือ สูงกว่า 10 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม (Ozogul *et al.*, 2005) จะเห็นได้ว่าทั้งค่า K และ ค่า TVB-N สามารถใช้เป็นดัชนีในการบอกถึงความสดของปูนิ่มได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chiou and Huang (2004) ที่พบว่าค่า K และ ค่า TVB-N สามารถใช้เป็นดัชนีในการบอกถึงความสดของปูทะเล (*Scylla serrata*) ได้เช่นกัน

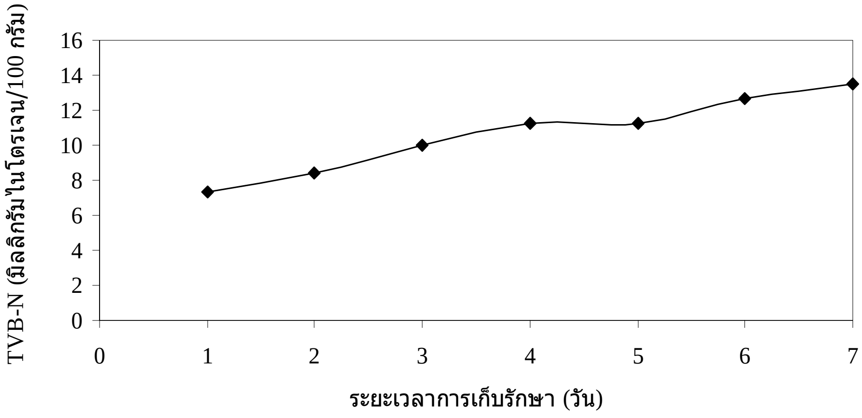
ปริมาณฮีสตามีน และ ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์

ปริมาณฮีสตามีน (ภาพที่ 10) และ ฟอร์มัลดีไฮด์ (ภาพที่ 11) พบว่าแม้ว่าค่าเฉลี่ยที่วัดได้ในแต่ละวันจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่ไม่ได้มีแนวโน้มที่แน่นอนจึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีในการบอกถึงความสดของปูนิ่มได้ โดยกรณีของปริมาณฮีสตามีนนั้น แม้ว่าในปูจะมีปริมาณกรดอะมิโนฮีสติดีนอยู่ก็ตามแต่ก็มีในปริมาณน้อย Chiou and Huang (2004) ได้ศึกษาปริมาณกรดอะมิโนในปูทะเล (*S. serrata*) พบว่ามีปริมาณฮีสติดีน 13 มิลลิกรัม/100 กรัม และการเกิดฮีสตามีนได้นั้นยังต้องมีปัจจัยหลายประการเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งหนึ่งในปัจจัยเหล่านั้น ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเบส โดยพบว่า ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6.0-6.5 มีส่วนช่วยให้เกิดฮีสตามีนจากเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส (Histidine decarboxylase) ที่เกิดจากแบคทีเรียมากขึ้น (Arnold and Brown, 1978; Lakshmanan *et al.*, 2002)

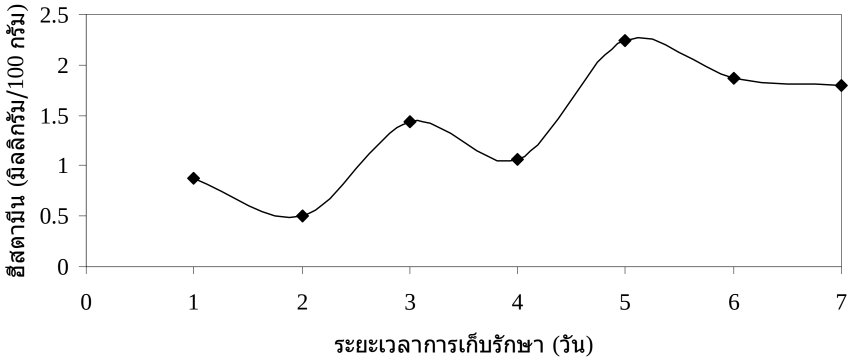
ซึ่งในกรณีของปูนิ่มเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้น ดังนั้น ค่าความเป็นกรดเบสจึงไม่เหมาะสมต่อการเกิดฮีสตามีน ส่วนปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ อธิบายได้ว่า การสลายตัวของไตรเมททิลามีนออกไซด์ (TMAO) เป็นไดเมททิลามีน (DMA) และฟอร์มัลดีไฮด์ โดยเอนไซม์ไตรเมททิลามีนออกไซด์ดีเมททิเลส (Trimethylamineoxide demethylase) ไม่ได้เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรีย แต่เกิดจากเอนไซม์ในสัตว์น้ำเอง ซึ่งในปูไม่พบรายงานว่ามีเอนไซม์ชนิดนี้ ทำให้ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ที่วัดได้มีปริมาณที่ไม่แน่นอน



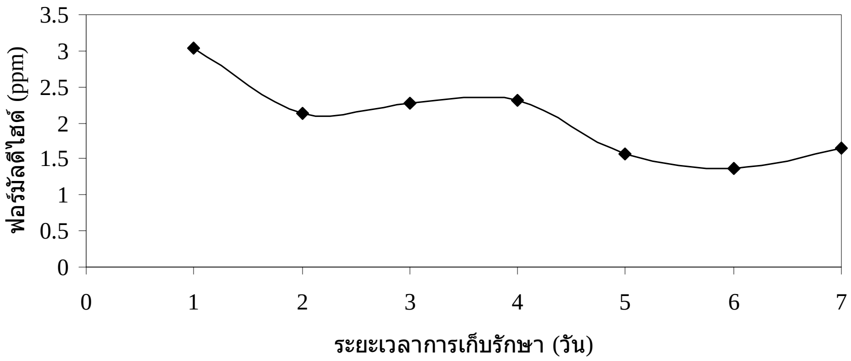
ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงค่า K ของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา



ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงค่า TVB-N ของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนของปูนิ่ม ตามระยะเวลาการเก็บรักษา

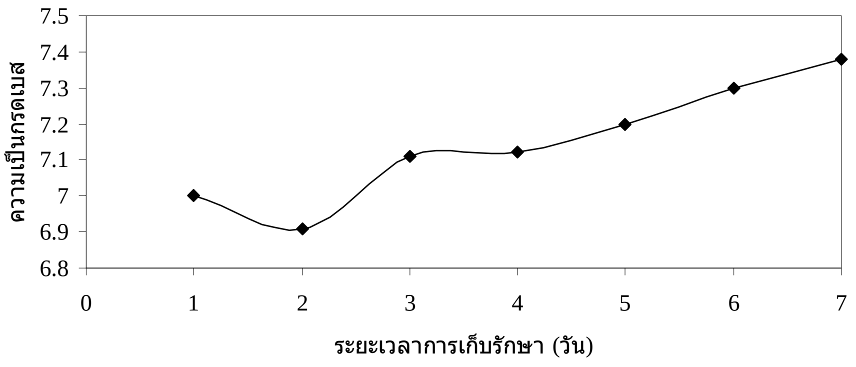


ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา

ค่าความเป็นกรดเบส

ส่วนค่าความเป็นกรดเบสนั้นพบว่า มีปริมาณสูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น (ภาพที่ 12) และ ค่าความเป็นกรดเบสที่วัดได้ในแต่ละวันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเริ่มต้นวันแรกที่ 7.00 จนกระทั่งถึง 7.38 ในวันที่ 7 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับค่า TVB-N ที่สูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้นเช่นกัน นั่นคือเมื่อค่า TVB-N เพิ่มขึ้นจึงส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้น และยังสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chiou and Huang (2004) ซึ่งได้เก็บรักษาปูทะเล (*S. serrata*) มีชีวิตที่ 10 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากการเก็บได้ 2 วันมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสและค่า TVB-N เกิดขึ้น โดยค่าความเป็นกรดเบสและค่า TVB-N ของปูสดเริ่มต้นมีค่า 6.99 และ 4.50 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100

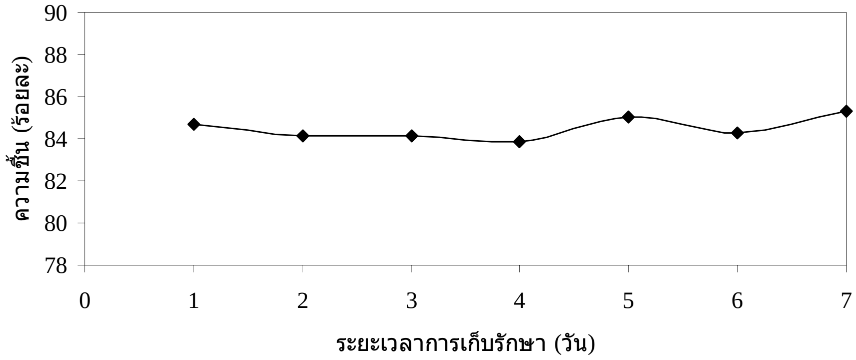
กรัม และเพิ่มขึ้นเป็น 8.32 และ 59.00 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 6 ของการเก็บรักษาที่ 10 องศาเซลเซียส ส่วนการเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส ในวันที่ 3 ค่าความเป็นกรดเบสและค่า TVB-N เพิ่มขึ้นเป็น 7.39 และ 43.80 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาปูนิ่มสดในการทดลองนี้เนื่องจากใช้อุณหภูมิต่ำกว่าเพียงแค่ 0-4 องศาเซลเซียส ทำให้การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นช้ากว่ามากถึงแม้จะเก็บรักษาในสภาพไม่มีชีวิตก็ตาม



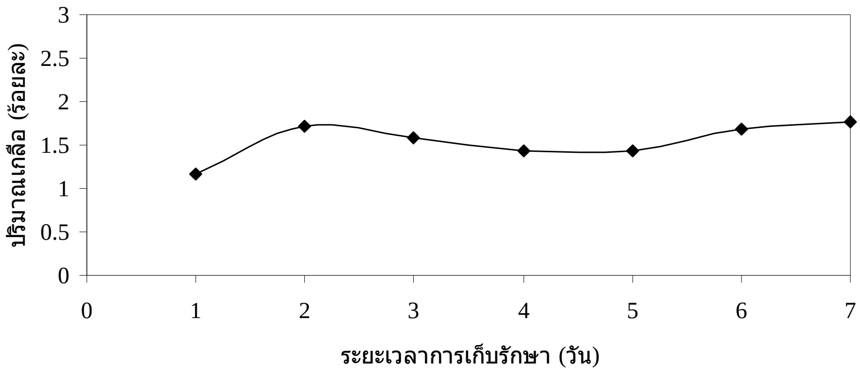
ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา

ปริมาณความชื้น และปริมาณเกลือ

ปริมาณความชื้น (ภาพที่ 13) และปริมาณเกลือ (ภาพที่ 14) ที่ได้จากการทดลองนั้นมีค่าเฉลี่ยค่อนข้างคงที่ และมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แม้ว่าหากพิจารณาการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่ม จะพบว่าอัตราการสูญเสียน้ำหนักจะเพิ่มขึ้นก็ตาม ทั้งนี้อาจเกิดจากการเตรียมตัวอย่างระหว่างการวิเคราะห์ค่าทางเคมีกับค่าทางกายภาพนั้นต่างกัน โดยตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าทางเคมี เป็นตัวอย่างที่ปั่นจนละเอียดแล้วนำไปเก็บในน้ำแข็งจึงไม่มีการสูญเสียน้ำหนัก ทำให้ปริมาณความชื้นค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ในขณะที่การวัดการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่ม เป็นการชั่งน้ำหนักปูนิ่มทั้งตัวแล้วนำน้ำหนักที่วัดได้มาคำนวณ



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา



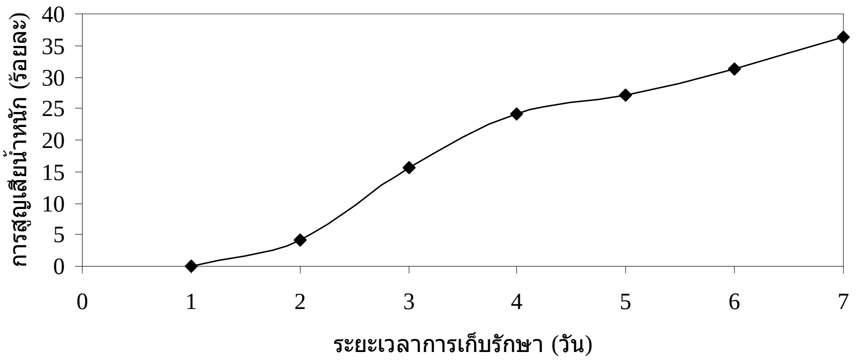
ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเกลือของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา

1.1.2 คุณภาพทางกายภาพ

การสูญเสียน้ำหนัก

พบว่าการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่ม มีปริมาณสูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น (ภาพที่ 15) และการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่วัดได้ในแต่ละวันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยในวันที่ 7 สูงถึงร้อยละ 36.36 ซึ่งการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่สูงขึ้นนั้นเกิดจากในกระบวนการลอกคราบ จะมีการดึงน้ำเข้าสู่ตัวปูในปริมาณมากเพื่อทำให้เปลือกเก่าปริออก ซึ่งน้ำเหล่านี้อยู่ในรูปน้ำอิสระถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่าย รวมถึงเกิดจากกระบวนการย่อยสลายตัวเอง เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวปูที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้โปรตีนบางส่วนถูกย่อยสลาย

ส่วนที่เป็น hydrophobic ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลต่อ conformation ของโปรตีน ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพ ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนจึงลดลง (Mizuta *et al*., 2001)



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษา

1.1.3 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

จากการใช้การทดสอบแบบ QDA ทำให้ได้คำอธิบายการให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพของปูนิ่มสดและเนื้อปูนิ่มนึ่งดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 หลักเกณฑ์การให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่มสด

คุณลักษณะ	คำอธิบาย	ระดับคะแนน
กระดองและลำตัว	กระดองมีสีตามธรรมชาติตามสายพันธุ์และสภาพแวดล้อม สีสดใส (เพศผู้มีสีเขียวอมเทา/เทาอมเขียว เพศเมียมีสีเขียวอมน้ำตาลหรือส้ม/สีน้ำตาลอมเขียว) กระดองนิ่ม ผิวกระดองตึง เรียบลื่น เนื้อสัมผัสแน่น ยืดหยุ่น กระดองติดแน่นกับลำตัว	5
	กระดองมีสีตามธรรมชาติตามสายพันธุ์และสภาพแวดล้อม สีไม่สดใส กระดองนิ่ม ผิวกระดองตึง เรียบ เนื้อสัมผัสแน่น ยืดหยุ่น กระดองติดแน่นกับลำตัว	4

ตารางที่ 2 (ต่อ)

คุณลักษณะ	คำอธิบาย	ระดับคะแนน
กระดองและลำตัว	กระดองมีสีจางลง ผิวกระดองไม่ตึงและสากเล็กน้อย เนื้อสัมผัสแน่นจนถึงนิ่มเล็กน้อย ยืดหยุ่นปานกลาง กระดองเริ่มแยกชั้นออกจากลำตัว	3
	กระดองมีสีจางลง ผิวกระดองไม่ตึงและสากเป็นกระดาษ เนื้อสัมผัสนิ่ม ยืดหยุ่นปานกลาง กระดองแยกชั้นออกจากลำตัว	2
	กระดองมีสีจางลง ผิวกระดองไม่ตึงและสากเป็นกระดาษ เนื้อสัมผัสนิ่มเละ กระดองแยกชั้นออกจากลำตัวชัดเจน	1
กลิ่น	กลิ่นปูนิ่มสดตามธรรมชาติ ไม่พบกลิ่นผิดปกติใดๆ	5
	กลิ่นปูนิ่มสดตามธรรมชาติ และเริ่มมีกลิ่นคาวเล็กน้อย	4
	กลิ่นคาวปานกลาง	3
	กลิ่นคาวชัดเจน	2
	มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นคาวจัด กลิ่นแอมโมเนีย	1

ตารางที่ 3 หลักเกณฑ์การให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่มนึ่ง

คุณลักษณะ	คำอธิบาย	ระดับคะแนน
เนื้อปู	สีขาว เป็นมัน ชุ่มน้ำ เนื้อจับกันเป็นก้อน แน่น ยืดหยุ่น มีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดเล็กและละเอียด (เป็นลิ่ม)	5
	สีขาว ชุ่มน้ำ เนื้อจับกันเป็นก้อน แน่นและยืดหยุ่น มีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดเล็กและละเอียด (เป็นลิ่ม)	4
	สีขาว เนื้อเริ่มไม่เป็นก้อน เนื้อสัมผัสแน่นจนถึงนิ่มเล็กน้อย ยืดหยุ่นปานกลาง เริ่มไม่เป็นเส้นใย	3
	สีขาวอมเหลือง หรือชมพู เนื้อเริ่มไม่เป็นก้อน เนื้อสัมผัสนิ่ม ไม่เป็นเส้นใย เริ่มเป็นแป้ง	2
	สีขาวอมเหลืองหรือสีชมพู เนื้อสัมผัสนิ่มและ ไม่เป็นเส้นใย เป็นแป้ง	1
กลิ่น	กลิ่นปูนิ่มนึ่งตามธรรมชาติ ไม่พบกลิ่นผิดปกติใดๆ	5
	กลิ่นปูนิ่มนึ่งตามธรรมชาติ และเริ่มมีกลิ่นคาวเล็กน้อย	4
	กลิ่นคาวปานกลาง	3
	กลิ่นคาวชัดเจน	2
	มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นคาวจัด กลิ่นแอมโมเนีย	1

ถึงแม้จะมีรายงานว่า ดัชนีชี้วัดคุณภาพปูนิ่มที่สำคัญคือ แอมโมเนีย (Sullivan, 2005) แต่ใช้วัดในลักษณะของ spoilage indicator ซึ่งจะตรวจพบเมื่อปูนิ่มเสื่อมคุณภาพแล้ว จึงไม่ใช้ค่าดังกล่าวสำหรับการศึกษาในครั้งนี้

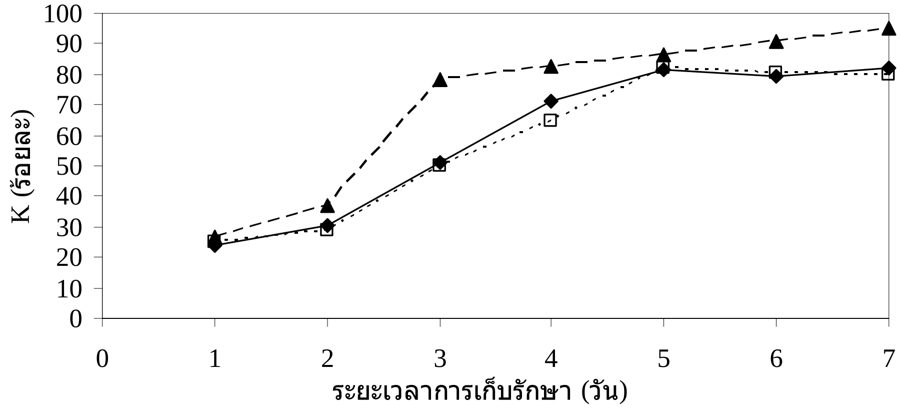
เมื่อนำ ค่า K ค่า TVB-N และคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มสด มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ พบว่า ทั้ง 3 ค่ามีความสัมพันธ์กัน โดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9520 และเมื่อแยกวิเคราะห์ความสัมพันธ์เป็นคู่ระหว่าง ค่า K กับคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มสด ค่า TVB-N กับคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มสด และค่า TVB-N กับค่า K พบว่าทั้ง 3 คู่มีความสัมพันธ์กัน โดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.7659 0.9343 และ 0.9005 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่า r^2 จะเห็นว่าค่า TVB-N มี r^2 ที่สูงกว่าค่า K ดังนั้น ดัชนีตรวจวัดความสดของปูนิ่มที่เหมาะสมที่สุดคือ ค่า TVB-N

1.2 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาปูนิ่มก่อนการแปรรูป

1.2.1 คุณภาพทางเคมี

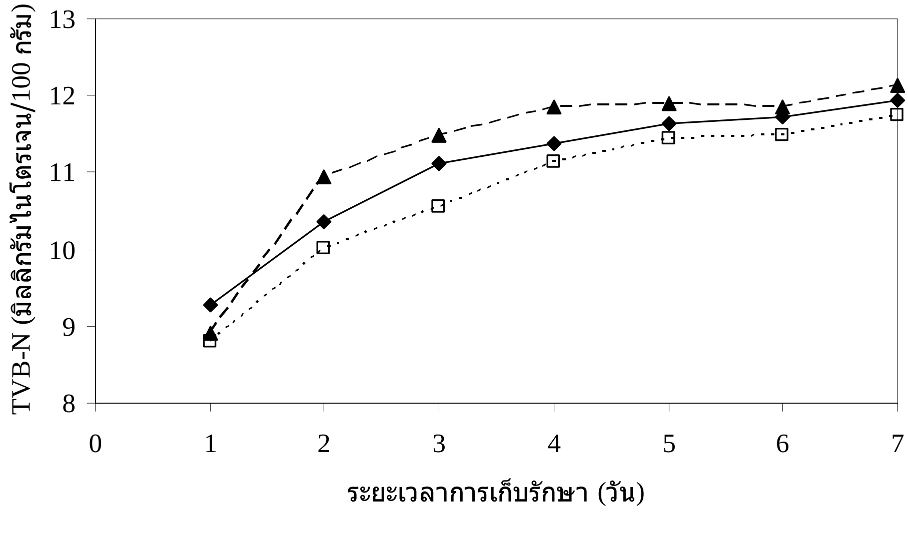
ผลการทดลองพบว่า สภาวะการเก็บรักษาปูนิ่มที่ต่างกันมีผลทำให้ค่า K แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีค่า K สูงที่สุด ส่วนปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งมีค่า K ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ ยังพบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า K เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้ง 3 สภาวะการเก็บรักษา (ภาพที่ 16) ส่วนค่า TVB-N นั้นให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน นั่นคือ สภาวะการเก็บรักษาปูนิ่มที่ต่างกันมีผลทำให้ค่า TVB-N (ภาพที่ 17) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีค่า TVB-N สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า TVB-N เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้ง 3 สภาวะการเก็บรักษาด้วยจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่าในระหว่างการเก็บรักษาปูนิ่มทั้ง 3 สภาวะนั้นยังคงเกิดการย่อยสลายตัวเอง การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ซึ่งวัดได้จากค่า K และการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนซึ่งสามารถติดตามได้จากการตรวจสอบค่า TVB-N แต่อย่างไรก็ตามสามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ด้วยการใช้น้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งเนื่องจากอุณหภูมิของทั้งสองสภาวะอยู่ที่ 0 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นผลให้ค่า K และค่า TVB-N ในปูนิ่มอยู่ใน

ระดับต่ำกว่าการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ozogul *et al*. (2005) พบว่า การเก็บรักษาปลา European eel (*Anguilla anguilla*) ในน้ำแข็งสามารถเก็บได้นาน 12-14 วันในขณะที่การเก็บรักษาที่ 3 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 5-7 วัน โดยผู้ทดสอบจะไม่ยอมรับตัวอย่างที่มีค่า TVB-N มากกว่า 10 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม.



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงค่า K ของปูนิ่มที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

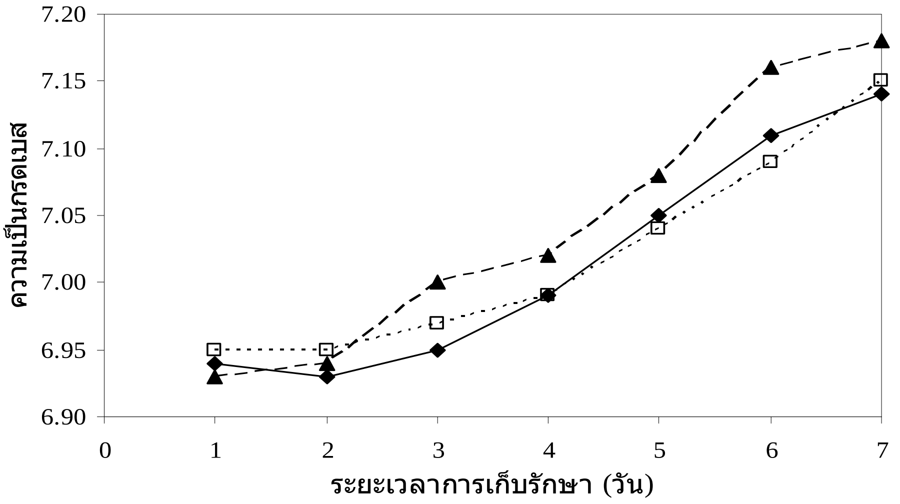
—◆— น้ำแข็ง ---□--- น้ำผสมน้ำแข็ง — —▲— — 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงค่า TVB-N ของปูนิ่มที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง ---□--- น้ำผสมน้ำแข็ง — —▲— — 4 องศาเซลเซียส

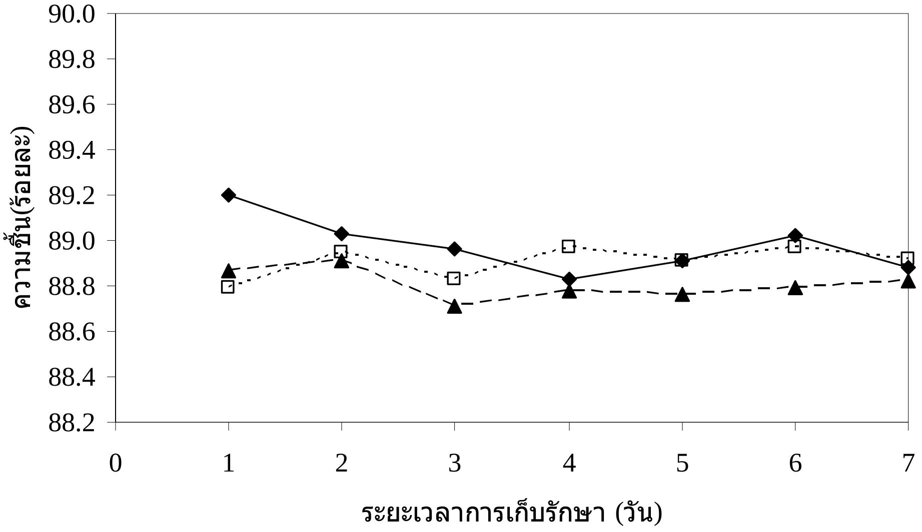
ส่วนค่าความเป็นกรดเบส แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ทำให้ค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้ง 3 สภาวะการเก็บรักษา และสภาวะการเก็บรักษาปูนิ่มที่ต่างกันมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดเบส แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรดเบสสูงสุด ส่วนปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งมีค่าความเป็นกรดเบสใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 18) Kyrana and Lougovois (2002) พบว่าความเป็นกรดเบสในปลา European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งจะเพิ่มขึ้นตามการสะสมของปริมาณด่างที่ระเหยได้ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวปลาหรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของสัตว์น้ำยังขึ้นอยู่กับการปลดปล่อย inorganic phosphate และแอมโมเนียในกระบวนการสลาย ATP รวมทั้งขึ้นกับสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ของเนื้อด้วย (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2000; Sikorski *et al.*, 1990)



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่ม ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน
—◆— น้ำแข็ง ---□--- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส

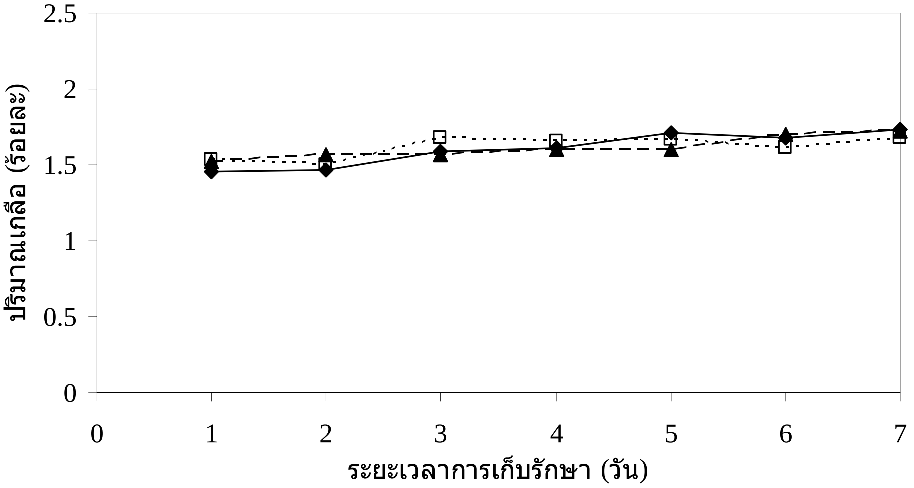
ปริมาณความชื้น (ภาพที่ 19) และปริมาณเกลือ (ภาพที่ 20) ทั้ง 3 สภาวะการเก็บรักษา พบว่า มีค่าเฉลี่ยค่อนข้างคงที่ และมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อีกทั้งระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้นมีผลทำให้ทั้งปริมาณความชื้นและปริมาณเกลือแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เช่นกัน ในขณะที่การวัดการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่ม พบว่า ทั้ง 3 สภาวะการเก็บรักษา มีปริมาณสูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น (ภาพที่ 20) และการ

สูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่วัดได้ในแต่ละวันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีการสูญเสียน้ำหนักสูงที่สุด ส่วนปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งมีการสูญเสียน้ำหนักใกล้เคียงกัน



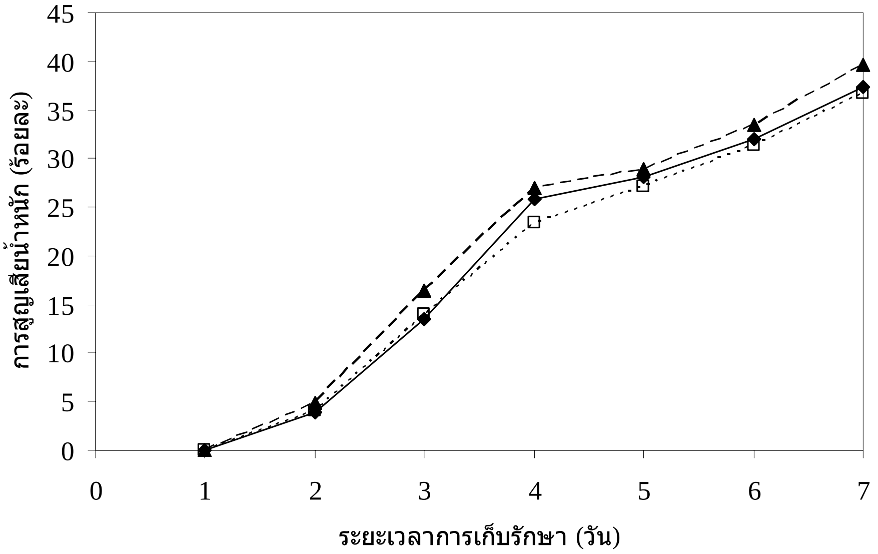
ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของปูนิ่ม ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

น้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเกลือของปูนิ่ม ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

น้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส

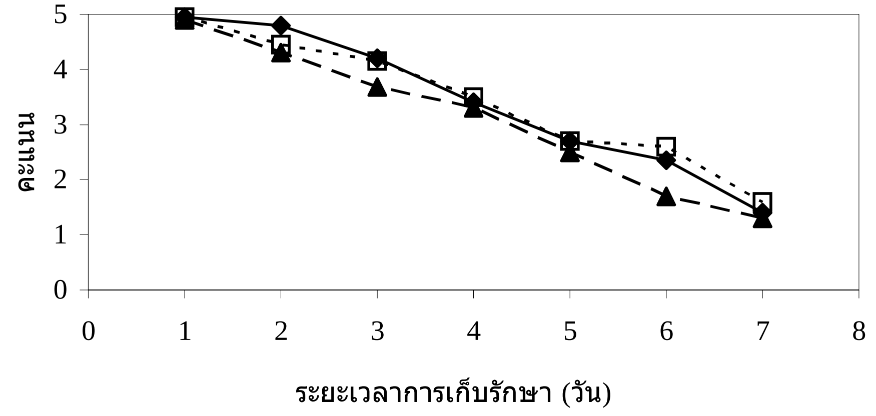


ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่ม ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง --□-- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส

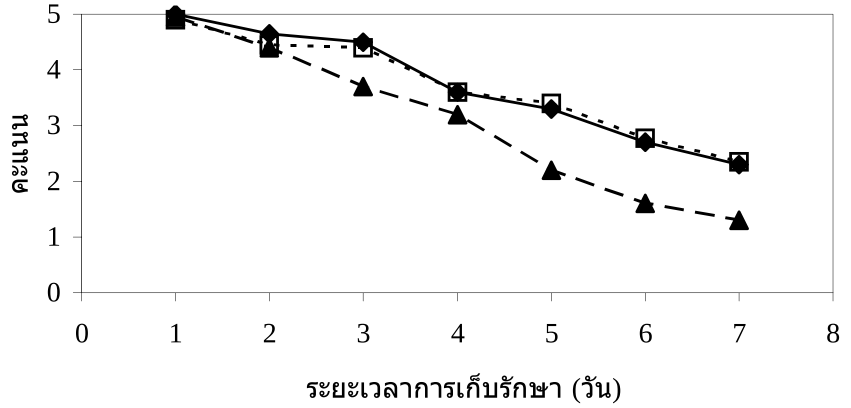
1.2.2 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผลการให้คะแนนตามเกณฑ์การให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพของปูนิ่มสด ทั้งในส่วนที่เป็นกระดองและลำตัว (ภาพที่ 22) คะแนนของกลิ่น (ภาพที่ 23) รวมถึงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพของปูนิ่มนึ่งทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อปู (ภาพที่ 24) และคะแนนของกลิ่น (ภาพที่ 25) พบว่าสภาวะการเก็บรักษาปูนิ่มที่ต่างกันให้ค่าคะแนนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการเก็บรักษาปูนิ่มในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งให้คะแนนสูงกว่าการเก็บรักษาปูนิ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา



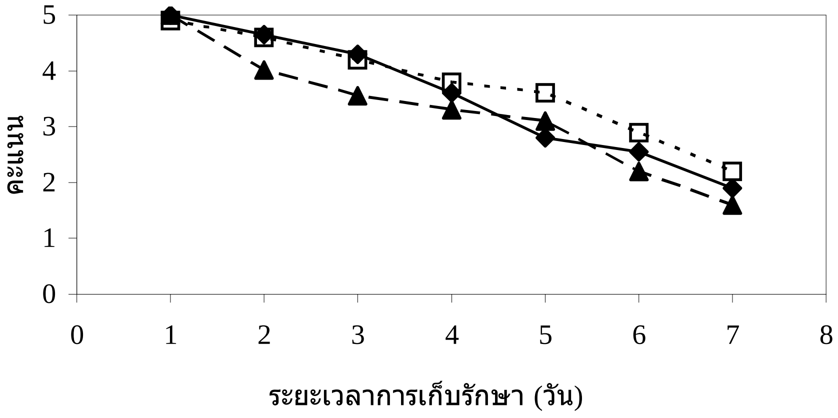
ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกระดองและลำตัวของปูนิ่มสด ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

น้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส



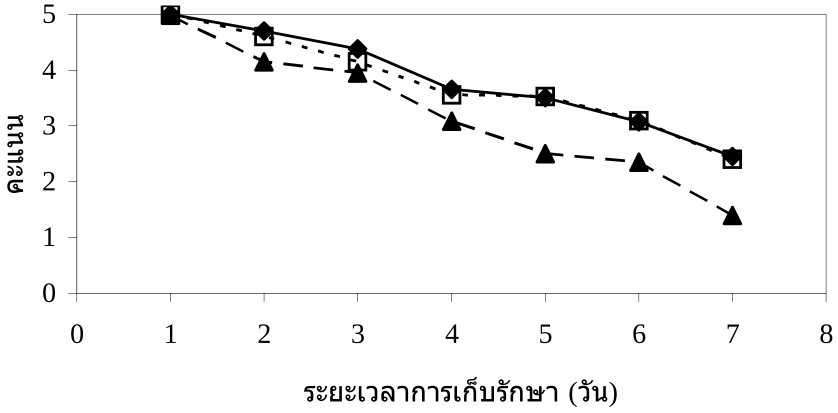
ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มสด ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

น้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 24 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพเนื้อของปูนิ่มนึ่ง ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง ---□--- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส



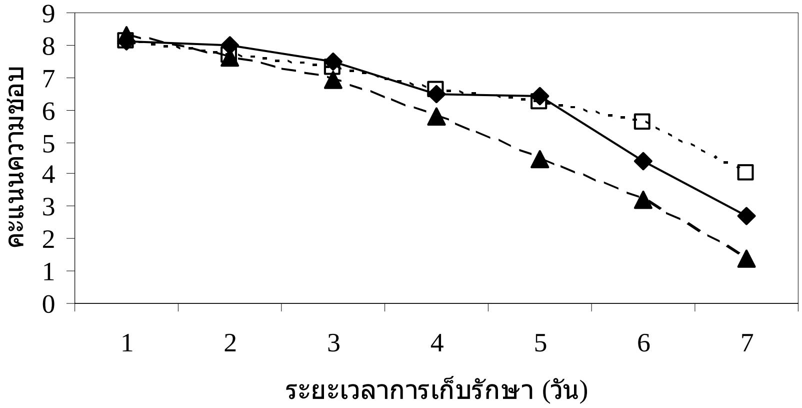
ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มนึ่ง ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง ---□--- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส

การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดด้านลักษณะปรากฏ สีกระดอง สีเปลือกด้านท้อง กลิ่น เนื้อสัมผัส ความชอบรวม พบว่า สภาวะการเก็บรักษาปูนิ่มที่ต่างกันมีผลทำให้คะแนนความชอบในทุกคุณลักษณะที่ทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งยังพบว่าสภาพการเก็บรักษามีปฏิสัมพันธ์ (interaction) กับระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าการเก็บรักษาปูนิ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น

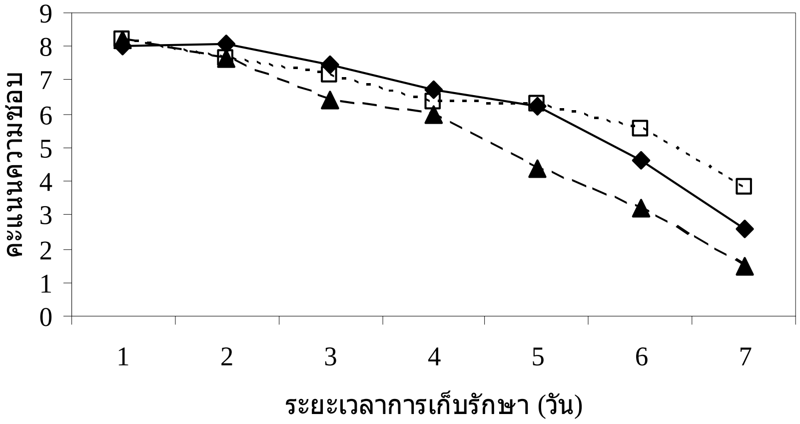
คะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ (ภาพที่ 26) และสีของกระดอง (ภาพที่ 27) ในวันแรกของการเก็บรักษาทั้ง 3 สภาวะมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นทำให้คะแนนความชอบลดลง โดยพบว่า ในวันแรกของการเก็บรักษาปูนิ่มทั้ง 3 สภาวะ กระดองของปูนิ่มจะมีลักษณะตึงและติดแน่นกับลำตัว แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น กระดองจะมีสีซีดลงและเริ่มแยกออกจากลำตัว รวมทั้งมีน้ำซึมออกจากตัวปูมากขึ้นจนกระทั่งผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบของปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็ง ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 6 ส่วนปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 5 และยังพบว่า การเก็บรักษาปูนิ่มในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งมีคะแนนความชอบสูงกว่าการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

คะแนนความชอบสีเปลือกด้านท้อง (ภาพที่ 28) ในวันแรกของการเก็บรักษาทั้ง 3 สภาวะมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นทำให้คะแนนความชอบลดลง โดยปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ถึงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 5-4) ในวันที่ 6 ขณะที่คะแนนความชอบของปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 6 มีคะแนนอยู่ในช่วงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 3)



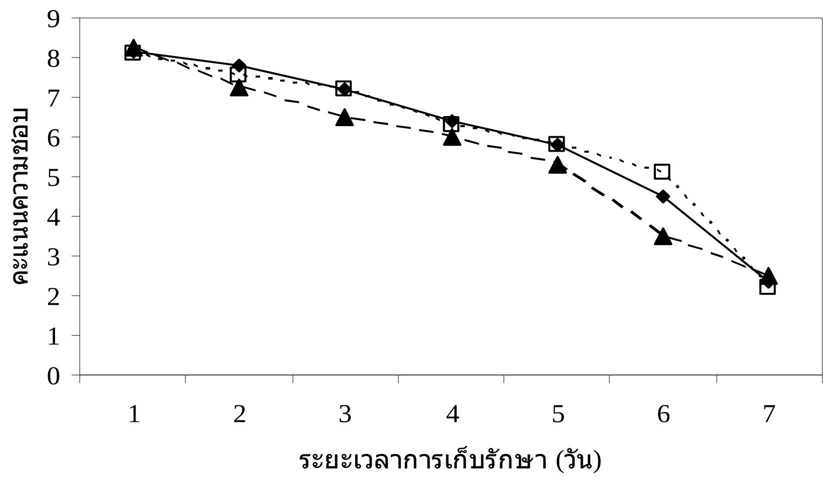
ภาพที่ 26 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของปูนิ่มสด ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง ---□--- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 27 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีกระดองของปูนิ่มสด ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง ---□--- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส



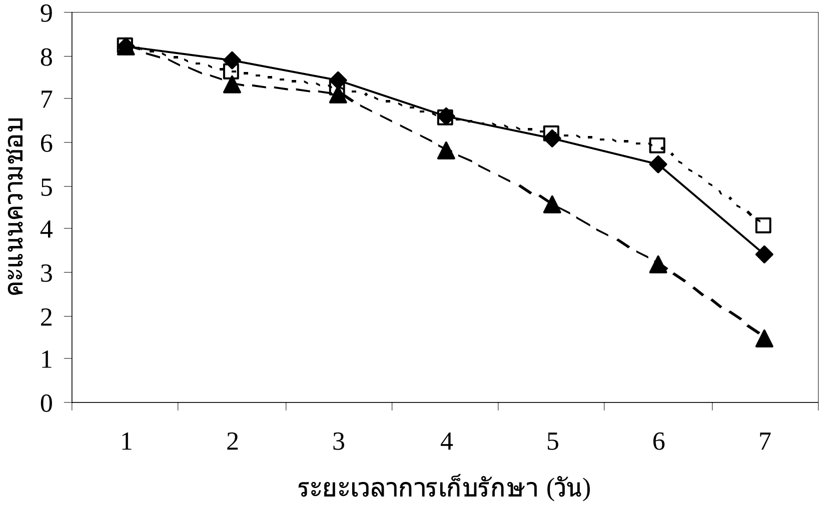
ภาพที่ 28 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีเปลือกด้านท้องของปูนิ่มสด ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

น้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส

คะแนนความชอบด้านกลิ่น (ภาพที่ 29) ในวันแรกของการเก็บรักษาทั้ง 3 สภาวะมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) ไม่พบกลิ่นผิดปกติใด ๆ เกิดขึ้น และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นทำให้คะแนนความชอบลดลง เนื่องจากเริ่มมีกลิ่นคาวและกลิ่นแอมโมเนียเพิ่มขึ้น ซึ่งกลิ่นดังกล่าวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจน โดยเกิดจากเอนไซม์ในสัตว์น้ำหรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ทำให้สัตว์น้ำเน่าเสีย เกิดเป็นไตรเมธิลเอมีน ไดเมธิลเอมีน และแอมโมเนีย (Yamagata and Low, 1995) การเกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ดังกล่าวทำให้ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบของปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็ง เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 4) ในวันที่ 7 ส่วนปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงไม่ชอบเล็กน้อยในวันที่ 5

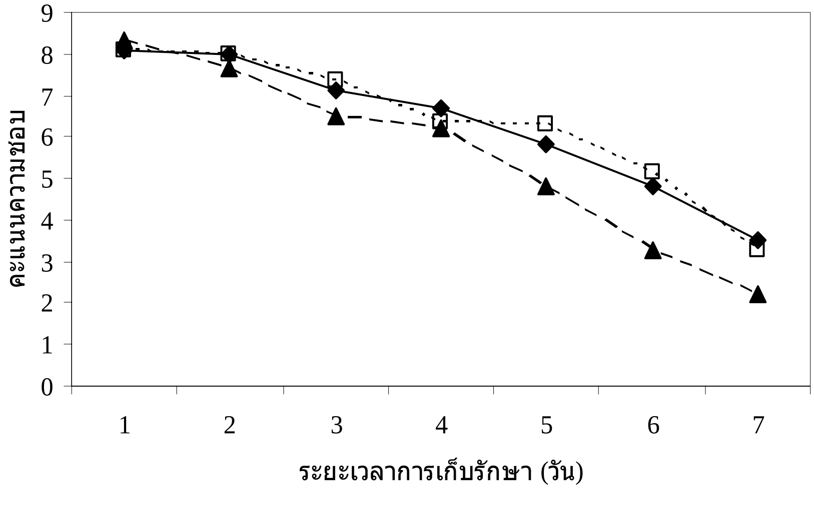
คะแนนความชอบด้านเนื้อสัมผัส (ภาพที่ 30) และคะแนนความชอบรวม (ภาพที่ 31) ในวันแรกของการเก็บรักษาทั้ง 3 สภาวะมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) เนื้อแน่น มีความยืดหยุ่นสูง และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นทำให้คะแนนความชอบลดลง เนื่องจากเนื้อเริ่มนิ่ม ความยืดหยุ่นลดลง จนกระทั่งนิ่มเละในที่สุด ทำให้ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบของปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งเริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 6 ส่วนปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เริ่มมีคะแนนอยู่

ในช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 5 และการเก็บรักษาปูนิ่มในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งได้รับคะแนนความชอบสูงกว่าการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา



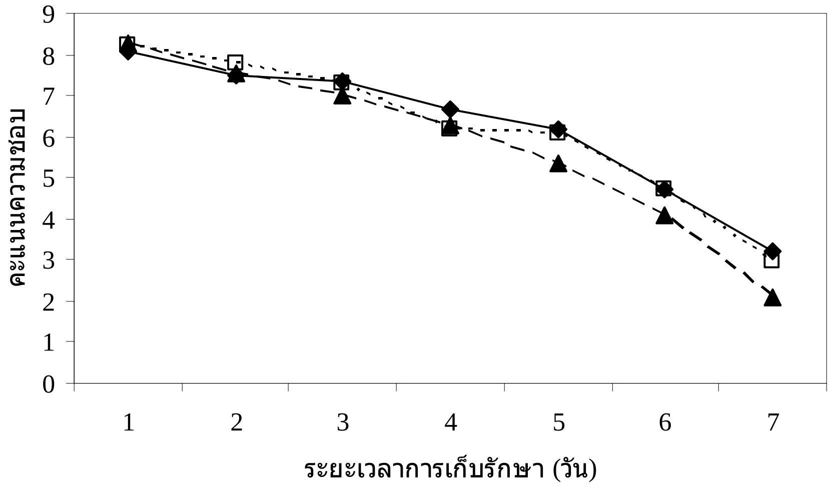
ภาพที่ 29 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของปูนิ่มสด ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง --□-- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 30 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของปูนิ่มสด ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง --□-- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 31 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มสด ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง --□-- น้ำผสมน้ำแข็ง --▲-- 4 องศาเซลเซียส

คะแนนความชอบของปูนิ่มสดในทุกคุณลักษณะ พบว่า ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบของปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็ง ที่ระดับคะแนนในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 6 และตัวอย่างปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ได้รับคะแนนความชอบในช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 5

การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านลักษณะปรากฏ สีเนื้อปู กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส ความชอบรวม พบว่า สภาวะการเก็บรักษาปูนิ่มที่ต่างกันมีผลทำให้คะแนนความชอบทุกคุณลักษณะที่ทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) อีกทั้งยังพบว่า สีเนื้อปู เนื้อสัมผัส และรสชาติของปูนิ่มในแต่ละสภาวะการเก็บรักษามีปฏิสัมพันธ์กับระยะเวลาในการเก็บรักษา ในขณะที่คุณลักษณะในด้านกลิ่น ลักษณะปรากฏ ความชอบรวม พบว่า สภาวะการเก็บรักษาไม่มีปฏิสัมพันธ์ (non-interaction) กับระยะเวลาในการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งใกล้เคียงกันและมีคะแนนความชอบสูงกว่าปูที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา

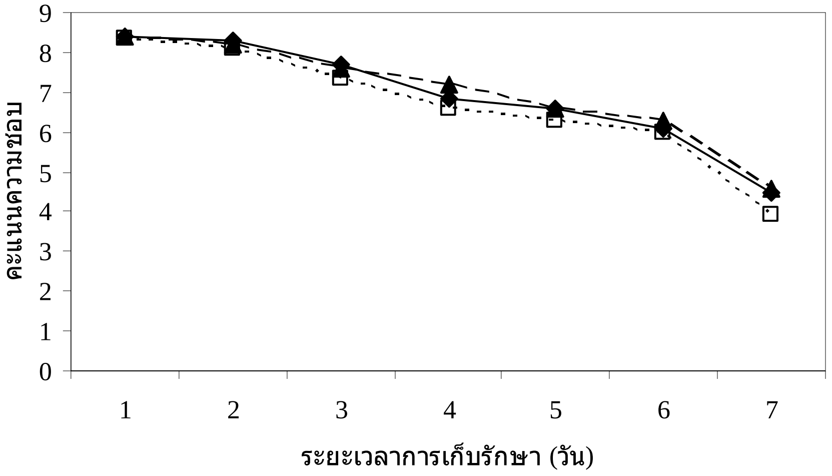
คะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ (ภาพที่ 32) และสีของเนื้อปู (ภาพที่ 33) ในวันแรกของการเก็บรักษาทั้ง 3 สภาวะมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) เนื้อปูมีสีขาว จับกันเป็นก้อน แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นทำให้คะแนนความชอบลดลง โดยสีของเนื้อปูเริ่มเป็นสีขาวอมเหลือง หรือขาวอมชมพู เนื่องจากเกิดการย่อยสลายและเสื่อม

สภาพของโปรตีนจากกิจกรรมของเอนไซม์ ทำให้แอสตาแซนทีน (astaxanthin) ซึ่งปกติจะรวมอยู่กับโปรตีนด้วยพันธะชนิดที่ไม่ใช่โควาเลนต์ เกิดเป็นแคโรทีโนโปรตีน (carotenoprotein) ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นรงควัตถุอิสระมากขึ้น ทำให้สีของเนื้อปูมีสีขาวอมเหลืองหรือชมพูมากขึ้น (Okada *et al*., 1994) จนผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็ง และ 4 องศาเซลเซียส เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ถึงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 5-4) ในวันที่ 7

คะแนนความชอบด้านกลิ่นของเนื้อปู (ภาพที่ 34) ในวันแรกของการเก็บรักษาทั้ง 3 สภาวะมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นทำให้คะแนนความชอบลดลง โดยทุกสภาวะการเก็บรักษา เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ถึงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 5 - 4) ในวันที่ 7 เช่นกัน แม้ว่าคะแนนความชอบด้านกลิ่นของปูนิ่มสดจะได้คะแนนความชอบอยู่ในช่วงไม่ชอบปานกลางถึงไม่ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 3-2) ก็ตาม ทั้งนี้ อาจเนื่องจากในการทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งนั้นมีการใช้ความร้อนในการเตรียมตัวอย่าง กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ จึงระเหยไปพร้อมกับไอน้ำ อีกทั้งการให้ความร้อนจะเร่งการสลายตัวของกรดอะมิโน (Chung and Cadwallader, 1994) และผลจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด ได้เป็นสารระเหยในกลุ่มคีโตนที่บ่งบอกลักษณะพิเศษของสัตว์ในกลุ่มสัตว์ทะเลที่มีเปลือกที่ผ่านกระบวนการหุงต้ม (Chang and Peterson, 1977) ซึ่งเป็นกลิ่นที่ผู้ทดสอบชอบ ทำให้คะแนนความชอบของกลิ่นเนื้อปูสูงกว่าในปูนิ่มสด

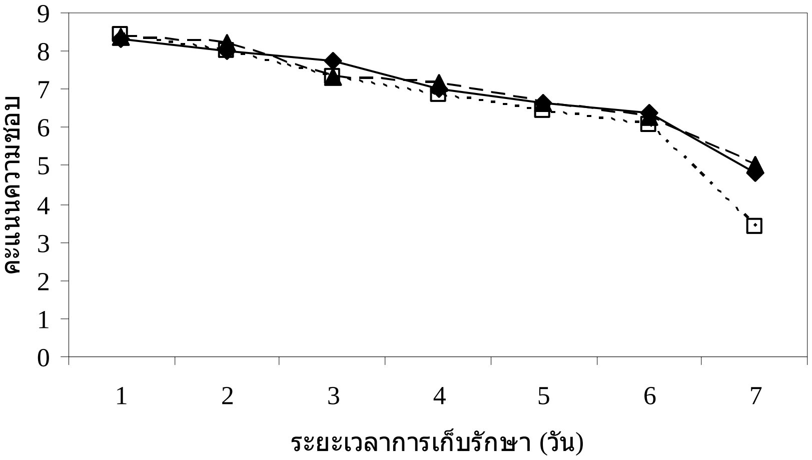
คะแนนความชอบด้านรสชาติของเนื้อปู (ภาพที่ 35) เนื้อสัมผัสของเนื้อปู (ภาพที่ 36) ความชอบรวมของเนื้อปู (ภาพที่ 37) ในวันแรกของการเก็บรักษาทั้ง 3 สภาวะมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) โดยเนื้อปูจะมีลักษณะชุ่มน้ำ รสหอมหวาน ซึ่งเกิดจากกรดอะมิโนอิสระจำพวก อะลานีน กลัยซีน อาร์จินีนที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อของปูต้ม (Chiou and Huang, 2003) รสอร่อยเกิดจากสารประกอบนิวคลีโอไทด์จำพวกอินโนซีนโมโนฟอสเฟต (IMP) และกัวนิซีนโมโนฟอสเฟต (GMP)ในกล้ามเนื้อ ซึ่งนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวจะไปกระตุ้นการรับรสหวานจากกลูตาเมต (Shahidi, 1998) ส่วนเนื้อสัมผัสของเนื้อปูจะมีความยืดหยุ่นสูง และลักษณะเส้นใยของกล้ามเนื้อจะเป็นเส้นใยขนาดเล็กและละเอียด เนื่องจากยังไม่มีการสลายตัวของโปรตีนในกล้ามเนื้อ แต่ภายหลังการตายเอนไซม์จะย่อยสลายทั้งสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น กรดอะมิโนอิสระ และนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งโปรตีนในกล้ามเนื้อ ทำให้เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น รสหอมหวาน รสอร่อย และความเป็นเส้นใยของกล้ามเนื้อลดลง ส่งผลให้

คะแนนความชอบลดลงตามไปด้วย โดยในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา พบว่า ปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งยังคงมีคะแนนความชอบอยู่ในช่วงชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 6) และปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีคะแนนความชอบอยู่ใน ช่วงเฉย ๆ ถึงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 5-4)



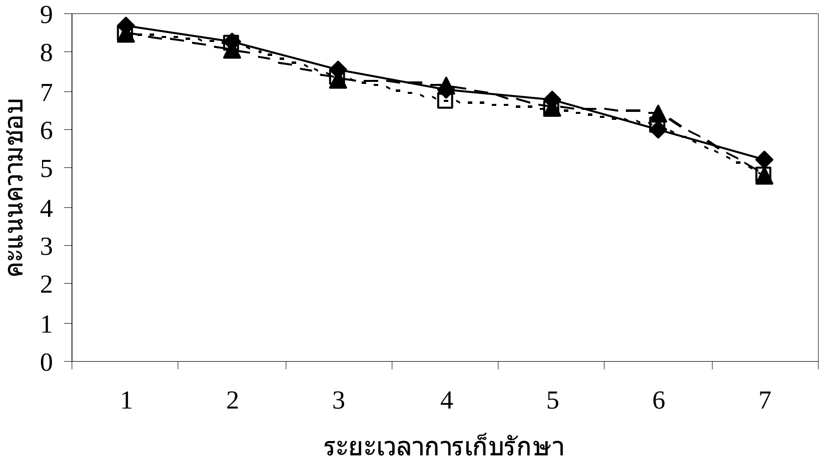
ภาพที่ 32 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของปูนิ่มนึ่ง ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

น้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส



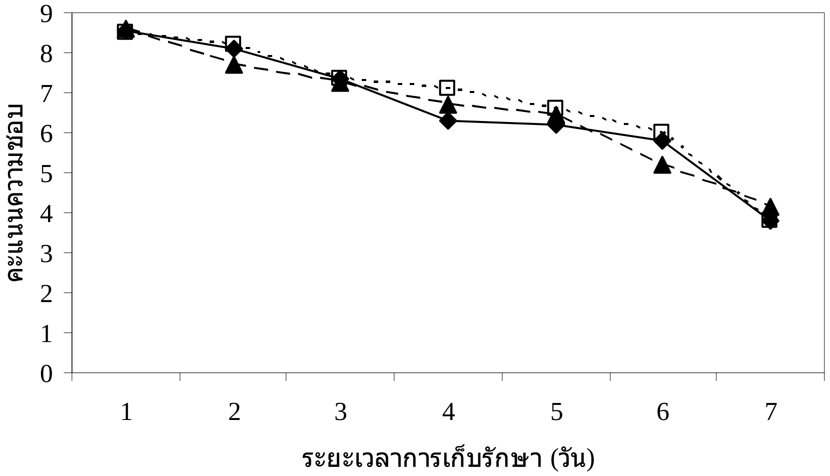
ภาพที่ 33 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีเนื้อของปูนิ่มนึ่ง ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

น้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส



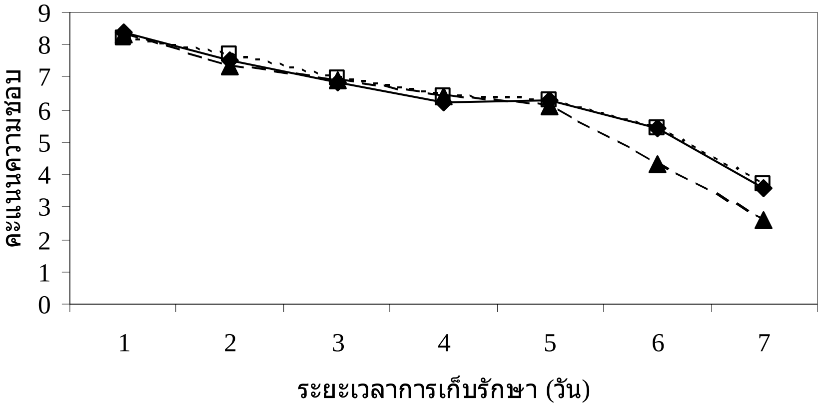
ภาพที่ 34 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของปูนิ่มนึ่ง ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง ---□--- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส



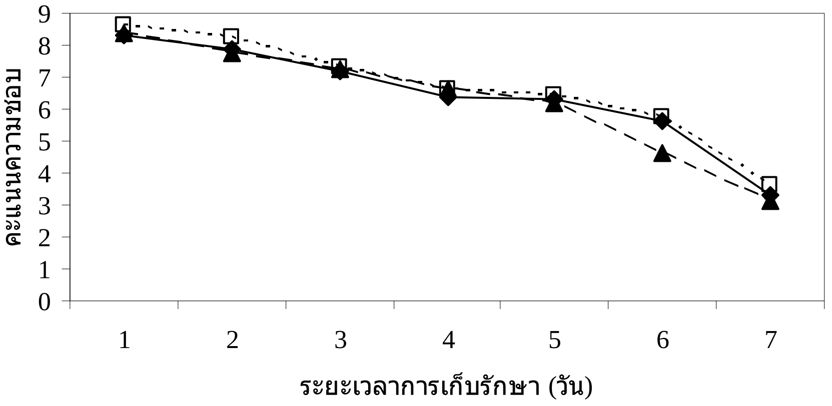
ภาพที่ 35 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรสชาติของปูนิ่มนึ่ง ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

—◆— น้ำแข็ง ---□--- น้ำผสมน้ำแข็ง —▲— 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 36 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของปูนิ่มนึ่ง ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

น้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 37 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มนึ่ง ที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

น้ำแข็ง น้ำผสมน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองไม่ว่าจะเป็นคุณภาพทางด้านเคมี กายภาพ รวมทั้งการทดสอบทางประสาทสัมผัส จะเห็นได้ว่า ปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งนั้นมีคุณภาพทั้ง 3 ด้านสูงกว่าการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งนี้เนื่องจากน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งสามารถแพร่กระจายความเย็นอย่างทั่วถึงในสัตว์น้ำ ซึ่งต่างจากการให้ความเย็นในระบบทางกล เช่น การให้อากาศเย็น (สุทธวัฒน์, 2548) และยังสามารถลดอุณหภูมิในปูนิ่มได้จนถึง 0 องศาเซลเซียส ซึ่งการลดอุณหภูมิสามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสทั้งในสัตว์น้ำและเอนไซม์จากจุลินทรีย์ รวมถึงยังมีบทบาทในการลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ลดลง (Rodtong *et al.*, 2005) ทำให้

การย่อยสลายของโปรตีนเกิดช้าลง (Huss, 1996) นอกจากนี้น้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งยังมีผลไปลดการสัมผัสกับออกซิเจนโดยตรง ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสซึ่งทำให้เกิดสีน้ำตาลในสัตว์น้ำเกิดช้าลงด้วย (Fatima *et al.*, 1988)

เมื่อพิจารณาคะแนนความชอบของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่ง จะเห็นได้ว่าคะแนนความชอบของปูนิ่มนึ่งในทุกคุณลักษณะมีคะแนนสูงกว่าในปูนิ่มสด ทั้งนี้อาจเกิดจากการเตรียมตัวอย่างในการทดสอบแตกต่างกัน โดยปูนิ่มนึ่งจะใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อปูในการทดสอบ อีกทั้งมีการให้ความร้อนกับตัวอย่าง ทำให้คะแนนความชอบของปูนิ่มนึ่งสูงกว่าปูนิ่มสด Morita *et al.* (2001) กล่าวว่ากลิ่นกุ้ง (shrimp aroma) ของกุ้งต้มจะมีกลิ่นที่รุนแรงกว่าในกุ้งสดเนื่องจากมีปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้เป็นองค์ประกอบของสารให้กลิ่นในปริมาณสูงกว่า ซึ่งในปูการต้มน่าจะมีผลเช่นเดียวกัน เนื่องจากกุ้งและปูเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียนเหมือนกัน

ในการพิจารณาอายุการเก็บรักษานั้น จะใช้คะแนนความชอบของปูนิ่มสดในการพิจารณา เนื่องจากเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคใช้พิจารณาในการเลือกซื้อปูนิ่มที่วางจำหน่ายตามท้องตลาดซึ่งพบว่า อายุการเก็บรักษาของปูนิ่มที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและน้ำผสมน้ำแข็งนั้นมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นั่นคือสามารถเก็บรักษาได้นาน 6 วัน ส่วนปูนิ่มที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ 5 วัน และจากการจัดการปูนิ่มภายในฟาร์ม ทั้งที่นางหงส์ฟาร์มและสมศักดิ์ฟาร์ม พบว่า หลังจากนำปูนิ่มมาแช่ในน้ำจืดแล้วเกษตรกรจะบรรจุปูนิ่มลงในกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิด แต่ฝากล่องจะถูกปิดบนตัวกล่องด้วยลวดเย็บกระดาษ ทำให้เกิดช่องว่างที่น้ำสามารถผ่านเข้าไปภายในได้ ดังนั้นวิธีการเก็บรักษาปูนิ่มที่เหมาะสมจึงควรเก็บรักษาปูนิ่มในน้ำแข็ง เนื่องจากหากเก็บรักษาปูนิ่มในน้ำผสมน้ำแข็งจะมีน้ำผ่านเข้าไปภายในกล่องพลาสติกที่มีปูนิ่มบรรจุอยู่ภายในได้ ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของปูนิ่มได้

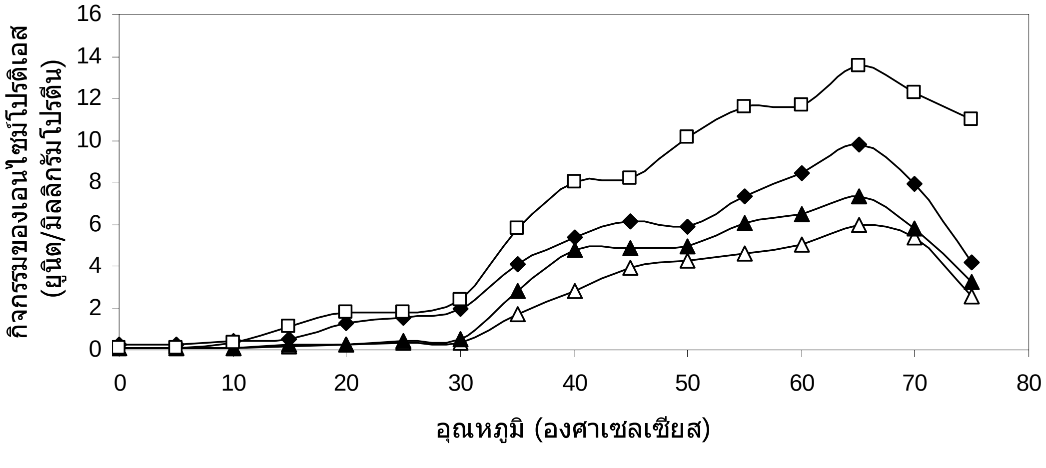
2. การศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลออกซิเดส ในปูนิ่ม

เอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลออกซิเดส มีผลต่อความแน่นเนื้อและการเปลี่ยนแปลงสีของปูนิ่มหลังการเก็บเกี่ยว การศึกษาถึงคุณลักษณะของเอนไซม์ดังกล่าว สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาให้อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์ ผลการศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ ของเอนไซม์ มีดังนี้

2.1 ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม

2.1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 0 – 75 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 7 พบว่าช่วงแรกเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นตั้งแต่ 0 – 30 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม ไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์ที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว เนื้อส่วนก้าม หรือแม้กระทั่งเฮพาโทแพนเครียสจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ และช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 – 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จากเนื้อเยื่อดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum temperature) โดยเอนไซม์ที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว เนื้อส่วนก้าม และเฮพาโทแพนเครียส มีกิจกรรมสูงสุด คือ 9.78, 7.29, 5.95 และ 13.55 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 75 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์กลับลดลงเหลือ 4.18, 3.22, 2.55 และ 10.96 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 38



ภาพที่ 38 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

◆ ทั้งตัว   □ เฮพาโทแพนเครียส

▲ เนื้อส่วนลำตัว   △ เนื้อส่วนก้าม

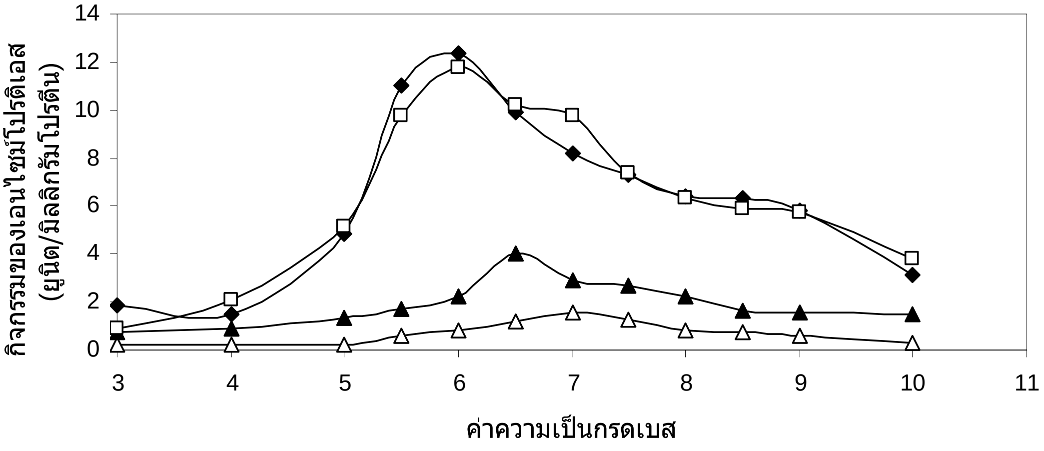
จากรายงานการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสัตว์น้ำ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสใน mid gut gland ของ mud crab มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ใน ช่วง 50 – 60 องศาเซลเซียส (Pavasovic *et al.,* 2004) ขณะที่ใน seminal plasma ของปูชนิดเดียวกัน เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Jayasankar and Subramoniam, 1997) ส่วนเอนไซม์จากระบบย่อยอาหารของปู *Geryon affinis และ Chionoecetes japonicus* มีกิจกรรมสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส (Galgani and Nagayama, 1988) เช่นเดียวกับในปู *Carcinus maenas* (Roy *et al*., 1996) Diaz-Tenorio *et al.* (2006) ศึกษาเอนไซม์โปรติเอสใน gastric juice และ mid gut ของปู 2 ชนิด ได้แก่ *Callinectes bellicosus* และ *C. arcuatus* พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 55 องศา-เซลเซียส ขณะที่ใน gastric fluid ของ *Cancer pagurus* มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55– 60 องศา-เซลเซียส (Saborowski *et al.,* 2004) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงคุณสมบัติของ Heat- activated protease

2.1.2 ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเบสต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว และเฮพาโทแพนเครียส พบว่าในช่วงแรกเมื่อ ค่าความเป็นกรดเบสสูงขึ้นตั้งแต่ 3 – 6 การเพิ่มค่าความเป็นกรดเบสจะมีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ และที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 12.33 และ 11.77 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นเป็น 6.5 – 10.0 กิจกรรมของเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดลง จนเหลือค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพียง 3.16 และ 3.77 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 10 ตามลำดับ

ส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากเนื้อส่วนลำตัว และเนื้อส่วนก้าม ในช่วงค่าความเป็นกรดเบส 3-7 ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว และเฮพาโทแพนเครียส นั่นคือ การเพิ่มค่าความเป็นกรดเบสจะเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อส่วนลำตัวมีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 4.06 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.5 ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อส่วนก้ามมีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 1.55 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 และ

เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นจนเท่ากับ 10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อปูนิ่มทั้ง 2 ส่วน จะลดลงจนเหลือเพียง 1.47 และ 0.33 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 39 การศึกษาของ Córdova Murueta *et al.* (2007) พบว่าค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทริพซินในกล้ามเนื้อของปลา *Synodus scituliceps* อยู่ที่ 7.5 ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อส่วนก้ามของปูนิ่มในการทดลองนี้



ภาพที่ 39 ผลของค่าความเป็นกรดเบสต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

◆ ทั้งตัว □ เฮพาโทแพนเครียส
▲ เนื้อส่วนลำตัว △ เนื้อส่วนก้าม

จากรายงานการศึกษาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสัตว์น้ำพบว่า เอนไซม์โปรติเอสของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนโดยทั่วไป มีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อกิจกรรมอยู่ในช่วง 5-9 (Garcia-Carreno, 1992; Garcia-Carreno *et al.*, 1994; Ceccaldi, 1997; Figueiredo *et al.*, 2001) ส่วนเอนไซม์โปรติเอสใน midgut gland ของ mud crab มีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 7 (Pavasovic *et al.,* 2004) ขณะที่ใน seminal plasma ของปูชนิดเดียวกัน เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากที่สุดในช่วงความเป็นกรดเบสที่ 7-9 (Jayasankar and Subramoniam, 1997) และเอนไซม์โปรติเอสจาก gastric fluid ของ *Cancer pagurus* มีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานใน ช่วง 5 – 7 (Saborowski *et al.,* 2004) เช่นเดียวกับใน midgut gland ของ*Cancer crangon* (Teschke and Saborowski, 2005) ส่วนของปู *Geryon affinis และ Chionoecetes japonicus* มีกิจกรรมสูงสุดที่ ค่าความเป็นกรดเบสในช่วง 5-7 (Galgani and Nagayama, 1988) Diaz-Tenorio *et al.*(2006) ศึกษาเอนไซม์โปรติเอสใน gastric juice และ mid gut ของปู 2 ชนิด ได้แก่ *Callinectes bellicosus* และ *C. arcuatus* พบว่ามีกิจกรรมของ

เอนไซม์สูงสุดที่ความเป็นกรดเบส 6 – 8 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ คือมีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดเบสในช่วง 6-7 จึงจัดเป็นนิวทรัลโปรติเอส

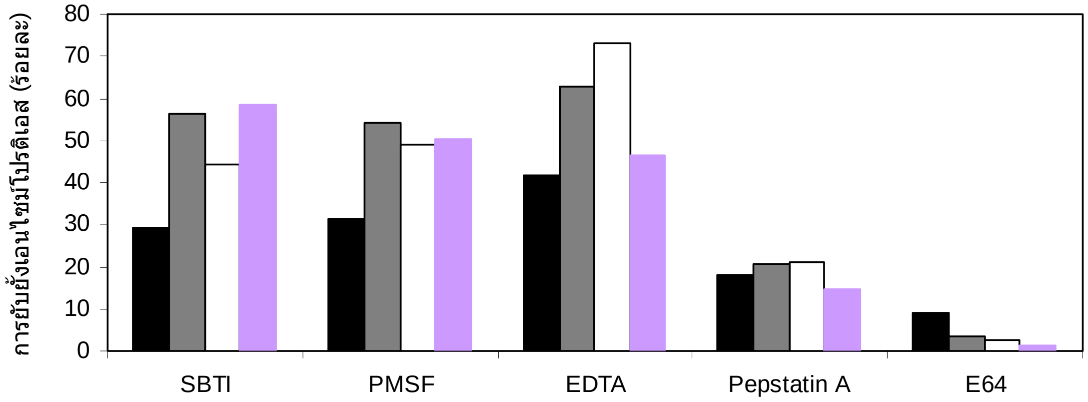
2.1.3 สารยับยั้งที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

การศึกษาผลของสารยับยั้งที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มโดยบ่ม crude enzyme กับสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Pepstatin A ซึ่งยับยั้งแอซิดโปรติเอส (Umezawa, 1976), EDTA ยับยั้งเมทาโลโปรติเอส (Tsuchiya *et al*., 1994), SBTI และ PMSF ยับยั้งซีรีนโปรติเอส (Birk, 1976; North, 1989) และ E 64 ยับยั้งซัลไฟดริลโปรติเอส (Hanada *et al*., 1978; North, 1989) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่า EDTA สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว และเฮพาโทแพน-เครียส ได้สูงที่สุด คือร้อยละ 41.72, 62.81 และ 72.98 ตามลำดับ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อส่วนก้ามถูกยับยั้งสูงสุดด้วย SBTI คือสามารถยับยั้งได้ร้อยละ 58.43 ดังภาพที่ 40

สำหรับ E64 นั้นมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มได้น้อยกว่าสารยับยั้งชนิดอื่น ๆ แสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว เนื้อส่วนก้ามรวมถึงเฮพาโทแพนเครียส ไม่ได้อยู่ในกลุ่มของซัลไฟดริลโปรติเอส เนื่องจาก E64 เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มดังกล่าว ซึ่งอาจจะระบุได้ว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์โปรติเอสในเนื้อเยื่อดังกล่าวของปูนิ่มไม่มีหมู่อนุมูลซัลไฟดริลเป็นองค์ประกอบ (Hanada *et al.,* 1978)

Asghar and Bhatti (1987) กล่าวว่า วิธีการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ สามารถใช้จำแนกกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยอาศัยความแตกต่างของหมู่อนุมูลที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งการที่เอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว รวมทั้งเฮพาโทแพนเครียสถูกยับยั้งการทำงานโดย EDTA สูงที่สุดนั้น ทำให้สรุปได้ว่า กลุ่มเอนไซม์หลักที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อดังกล่าว คือ กลุ่มของเมทาโลโปรติเอส เนื่อง จาก EDTA เป็นสารที่สามารถจับกับไอออนของโลหะพวกไดแวเลนต์ หรือพวกที่มีเลขออกซิเดชั่นสูงกว่าสองได้ และเมทาโลโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีไอออนของโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ที่อยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ และเมื่อไอออนของโลหะนี้ถูกจับโดยสารจับไอออนโลหะ (metal-

chelating agent) จะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถนำไอออนนั้นมาใช้ได้ และกิจกรรมของเอนไซม์จะถูกยับยั้งไปด้วย (ปราณี, 2547) ในขณะที่กลุ่มเอนไซม์หลักที่สกัดได้จากเนื้อส่วนก้ามเป็นกลุ่มของซีรีนโปรติเอส เนื่องจากถูกยับยั้งสูงสุดด้วย SBTI จึงอาจจะระบุได้ว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์โปรติเอสในเนื้อเยื่อดังกล่าวของปูนิ่มมีหมู่อนุมูลซีรีนอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Ohkubo *et al.* (2004) ซึ่งศึกษาเอนไซม์โปรติเอสในกล้ามเนื้อของปลา crucian carp พบว่า SBTI สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงที่สุดเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 40 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

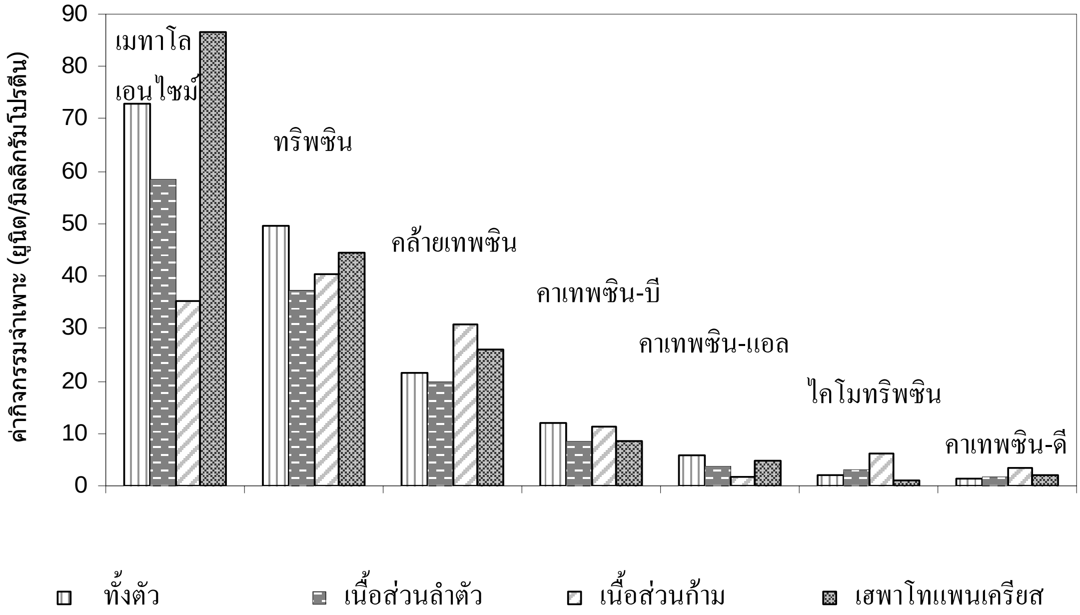
■ ทั้งตัว □ เฮพาโทแพนเครียส

■ เนื้อส่วนลำตัว ■ เนื้อส่วนก้าม

2.1.4 ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มต่อสับสเตรท

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มต่อสับสเตรท ชนิดต่างๆ ได้แก่ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์คล้ายทริพซิน, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ทริพซิน, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC เป็นสับสเตรท ของไคโมทริพซิน, Z-Arg-Arg-AMC เป็นสับสเตรทของคาเทพซิน-บี, Z-Phe-Arg-AMC เป็นสับสเตรทของคาเทพซิน-แอล, Phe-Ala-Ala เป็นสับสเตรทของคาเทพซิน-ดี และ Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-AMC เป็นสับสเตรทของเมทาโลโปรติเอส พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัวรวมทั้งเฮพาโทแพนเครียสมีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรทของเมทาโลโปรติเอสสูงที่สุด คือมีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 72.88, 58.49 และ 86.43 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ขณะที่เอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อส่วนก้ามมี

ความจำเพาะเจาะจงสูงสุดกับสับสเตรทของทริพซิน โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 40.45 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 41



ภาพที่ 41 ความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

วิธีการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของสับสเตรทต่อเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ สามารถใช้จำแนกกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสได้ เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อชนิดของอนุมูลกรดอะมิโนบนโพลีเปปไทด์สับสเตรท (Polypeptide substrate) เช่น ทริพซินมีความจำเพาะต่ออนุมูล Lys, Arg (Barret, 2001; Schechter and Beger, 1967) ซึ่งจากผลการทดลองในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่ากลุ่มเอนไซม์หลักที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว รวมทั้งเฮพาโทแพนเครียส คือ กลุ่มของเมทาโลโปรติเอส ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้สามารถไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ของสับสเตรทที่มีชนิดของอนุมูลกรดอะมิโนจำเพาะเจาะจง คือ Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-AMC ได้มากที่สุด ขณะที่เอนไซม์ทริพซินเป็นเอนไซม์หลักที่สกัดได้จากเนื้อส่วนก้าม ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์บริเวณอนุมูลกรดอะมิโนจำเพาะเจาะจงคือ Boc-Gln-Ala-Arg-AMC มากที่สุด โดยทริพซินที่อยู่ในกล้ามเนื้อส่วนก้ามของปูนั้น อาจจะเป็นทริพซินซึ่งอยู่ในกลุ่มของซีรีนโปรติเอสจากซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic serine protease:SSP) หรือเป็นซีรีนโปรติเอสที่ไปจับกับโปรตีนไมโอฟิบริลลา ซึ่งเรียกว่า myofibril-bound serine protease: MBSP) ก็ได้ (Ohkubo, 2004)

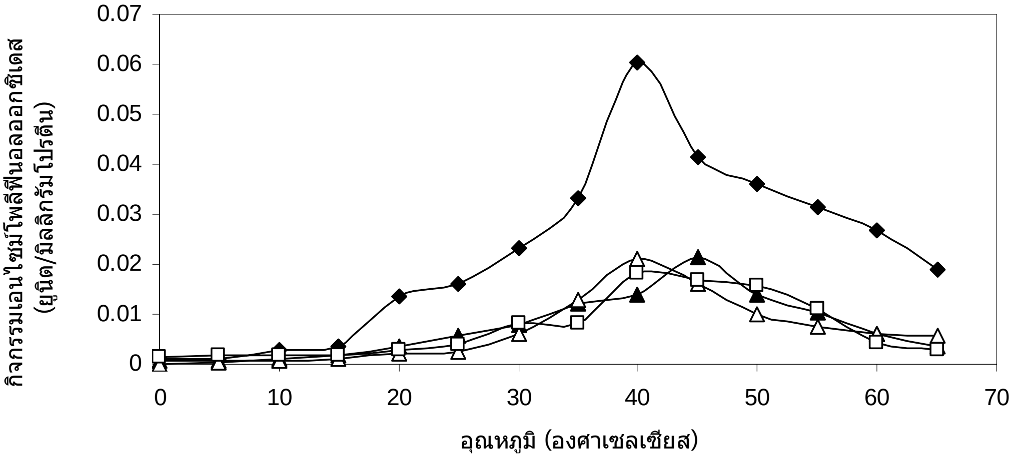
ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในข้อ 2.1.3 ทำให้สรุปได้ว่า กลุ่มเอนไซม์หลักที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัวและเฮพาโทแพนเครียส คือ กลุ่มของเมทาโลโปรติเอส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sakharov *et al.* (2000) ซึ่งพบว่า เอนไซม์โปรติเอสในเฮพาโทแพนเครียส ของปู *Paralithodes camtschatica* อยู่ในกลุ่มของเมทาโลโปรติเอสเช่นกัน ส่วนเอนไซม์หลักที่สกัดได้จากเนื้อส่วนก้ามของปูนิ่ม ได้แก่ เอนไซม์ทริพซิน

2.2 คุณลักษณะของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในปูนิ่ม

2.2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มที่อุณหภูมิระหว่าง 0 – 65 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นตั้งแต่ 25 – 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนก้ามและเฮพาโทแพนเครียสจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ และพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด คือ 0.060, 0.021 และ 0.018 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นระหว่าง 45-65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อเยื่อดังกล่าวกลับค่อย ๆ ลดลง ขณะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นั้นเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อส่วนลำตัวมากที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 0.022 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์เหลือเพียง 0.003 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 42

จากรายงานการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสัตว์น้ำ พบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในกุ้ง (*P. japonicus*) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 35-60 องศาเซลเซียส (Montero *et al*., 2001; Benjakul *et al*., 2005) ในขณะที่ Liu *et al.* (2006) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในปู (*Charybdis japonica*) เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับในกุ้ง *Penaeus chinensis* (Fan and Wang, 2002) สอดคล้องกับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มที่ได้จากการศึกษานี้ ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิช่วง 40-45 องศาเซลเซียส เช่นกัน



ภาพที่ 42 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

—◆— ทั้งตัว —□— เฮพาโทแพนเครียส

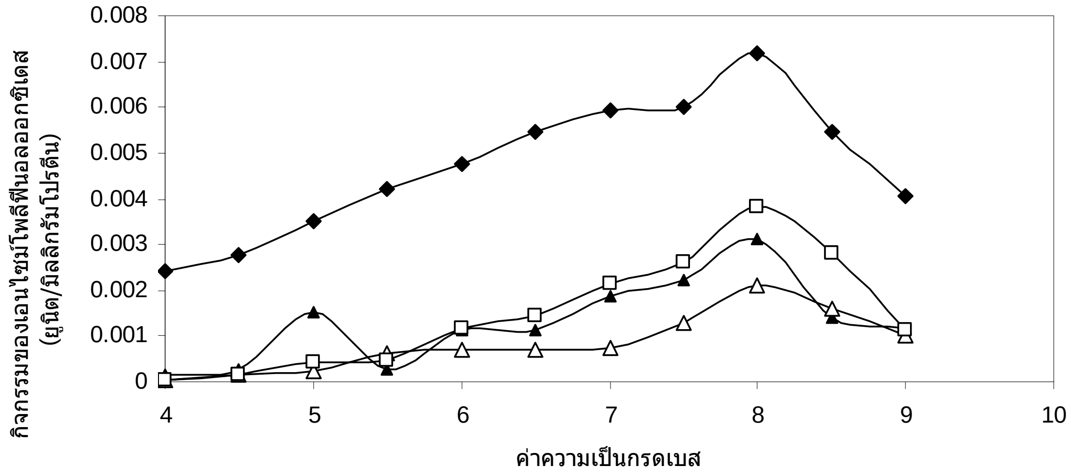
—▲— เนื้อส่วนลำตัว —△— เนื้อส่วนก้าม

2.2.2 ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

การศึกษาผลของความเป็นกรดเบสต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม พบว่าในช่วงแรกเมื่อค่าความเป็นกรดเบสสูงขึ้นตั้งแต่ 4 – 8 การเพิ่มค่าความเป็นกรดเบสจะเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนก้าม รวมทั้งส่วนของเฮพาโทแพนเครียสด้วย และที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 0.007, 0.002 และ 0.004 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ขณะเดียวกันยังพบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อส่วนลำตัวนั้นมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่ค่าความเป็นกรดเบส 2 ระดับ คือ 5 และ 8 ทั้งนี้อาจมีความเป็นไปได้ว่าในเนื้อเยื่อดังกล่าวมีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เป็น isoenzymes กัน (Montero *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตามเมื่อค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นเป็น 8.5 และ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อเยื่อทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นปูทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว เนื้อส่วนก้ามรวมทั้งเฮพาโทแพนเครียส จะลดลงจนเหลือค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพียง 0.004, 0.001, 0.001 และ 0.001 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 9 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 43

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ที่จะเห็นว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลลออกซิเดสที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัวซึ่งมีส่วนของเปลือกรวมอยู่ด้วย มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเนื้อเยื่อ

ส่วนลำตัวและส่วนก้าม สอดคล้องกับการศึกษาของ Montero *et al.* (2001) ที่พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลลอกซิเดสที่สกัดจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของกุ้ง (*Penaeus japonicus*) มีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน โดยเอนไซม์ที่สกัดจากเปลือกที่หุ้มส่วนหัวและอกมีกิจกรรมสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ เปลือกส่วนหาง เปลือกหุ้มส่วนหัวและอกที่มีคิวติเคิลติดอยู่ คิวติเคิล และกล้ามเนื้อบริเวณลำตัว ตามลำดับ



ภาพที่ 43 ผลของค่าความเป็นกรดเบสต่อกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

—◆— ทั้งตัว —□— เฮพาโทแพนเครียส

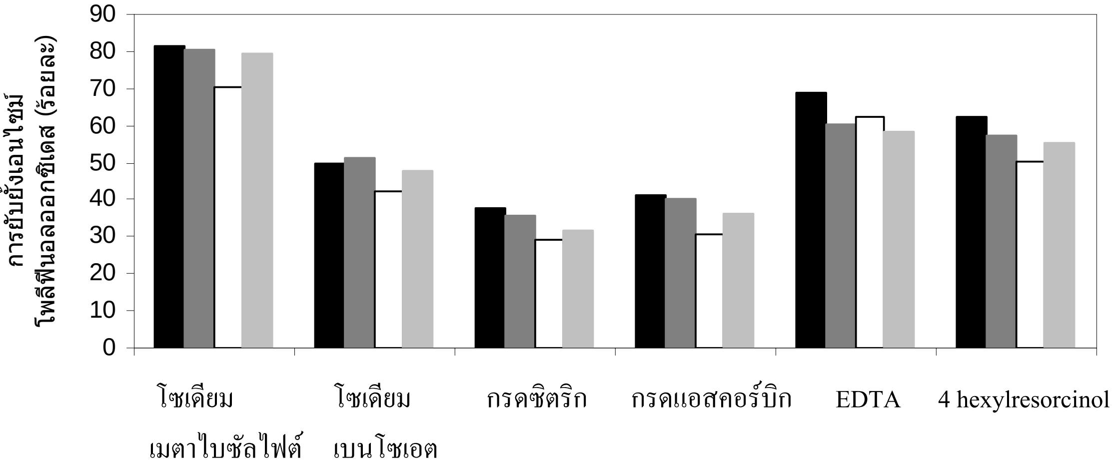
—▲— เนื้อส่วนลำตัว —△— เนื้อส่วนก้าม

จากรายงานการศึกษาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสัตว์น้ำ พบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในปู *Charybdis japonica* มีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 6 (Liu *et al.,* 2006) เช่นเดียวกับกุ้ง *Penaeus chinensis* (Fan and Wang, 2002) ในขณะที่ Montero *et al.* (2001) พบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออก-ซิเดสในกุ้ง (*Penaeus japonicus*) มีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 5 และ 8 Christopher *et al.* (2006) ศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเลือดของปู *Callinectes sapidus* พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ค่าความเป็นกรดเบสในช่วง 6.6 – 7.8 เช่นเดียวกับใน hemocytes ของกุ้ง *Penaeus californiensis* (Gollas-Galván *et al*., 1999) และ *Procambarus clarkia* (Cardenas and Dankert, 2000) Chen *et al*. (1991b) ศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสใน

Western Australian lobster พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดเบสในช่วง 6-8 สอดคล้องกับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในปูนิ่ม ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 เช่นกัน

2.2.3 สารยับยั้งที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออก-ซิเดส จากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่มโดยบ่ม crude enzyme กับสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กรดซิตริก 5 มิลลิโมลาร์ กรดแอสคอร์บิก 5 มิลลิโมลาร์ โซเดียมเบนโซเอต 5 มิลลิโมลาร์ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 5 มิลลิโมลาร์ 4 hexylresorcinol 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ พบว่า โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว เนื้อส่วนก้าม และเฮพาโทแพนเครียสได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 81.25, 80.33, 70.23 และ 79.34 ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ EDTA, 4-hexylresorcinol, โซเดียมเบนโซเอต, กรดแอสคอร์บิก และ กรดซิตริก ดังแสดงในภาพที่ 44



ภาพที่ 44 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของปูนิ่ม

■ ทั้งตัว □ เฮพาโทแพนเครียส

■ เนื้อส่วนลำตัว ■ เนื้อส่วนก้าม

การที่โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงที่สุด เนื่องจากสารประกอบซัลไฟต์ไปขัดขวางกระบวนการเปลี่ยนสารออโท-ไดฟีนอล (*O*-Diphenols) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น (dehydrogenation) ต่อไป ได้เป็นออโท-ควิโนน (*O*-quinones) ซึ่งสารควิโนนที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนแปลง และทำปฏิกิริยาต่อไปกับสารประกอบฟีนอล กรดอะมิโน และสารอื่น ๆ ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ เมลานิน (melanin) ซึ่งเป็นสารสีน้ำตาลดำ (Markakis and Embs, 1966; Ferrer *et al*., 1989a; Chen, *et al*., 1991a) อีกทั้งโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ยังมีผลไปรบกวนโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เอื้อต่อการจับตัวกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (Sayavedra-Soto and Montgomery, 1986) และยังสามารถรีดิวซ์ออโท-เบนโซควิโนน (*O*-benzoquinones) กลับไปเป็นออโท-ไดฟีนอล (*O*-Diphenols) ทันทีที่ออโท-เบนโซควิโนน (*O*-benzoquinones) ถูกสร้างขึ้น ดังนั้นปฏิกิริยาสีน้ำตาลจะไม่เกิดขึ้น (Ferrar and Walker, 1999)

จากรายงานการศึกษาผลของสารยับยั้งที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในในสัตว์น้ำ พบว่า โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในปู *Callinectes sapidus, Charybdis japonica* ได้สูงที่สุด (Christopher *et al*., 2006; Liu *et al.,* 2006) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Montero *et al*. (2001) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในกุ้ง (*Penaeus japonicus*) เกิดน้อยที่สุดหากใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการยับยั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในปูนิ่มที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

ในส่วนของอุณหภูมินั้น ถือได้ว่ามีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อโครงสร้างของโปรตีน แต่ส่วนใหญ่แล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์จะไม่ใช่อุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิของร่างกาย (physiological temperature) การที่เอนไซม์มีกิจกรรมแตกต่างกันไปแต่ละช่วงอุณหภูมินั้นสามารถอธิบายได้ว่า อุณหภูมิของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นจะช่วยเพิ่มอัตราการชนกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท ทำให้โอกาสที่จะเกิดผลผลิตมีสูงขึ้นเช่นกัน แต่ถ้าอุณหภูมิสูงมากเกินไป จะมีผลต่อการเพิ่มอัตราการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ได้ด้วย (ปราณี, 2547)

ความสำคัญของค่าความเป็นกรดเบสต่อกิจกรรมของเอนไซม์นั้น พบว่า การที่ค่าความเป็นกรดเบสบางช่วงมีสภาพไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น อาจจะมีสาเหตุมาจากการที่ค่าความเป็นกรดเบสในช่วงดังกล่าว มีผลต่อการเกิดการแตกไอออน (ionization) ของ

prototropic group ที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ แล้วทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติ ไปอยู่ในรูปที่ไม่เหมาะสมต่อการจับกับสับสเตรท จึงส่งผลให้เอนไซม์มีกิจกรรมลดลง หรืออาจเกิดจากค่าความเป็นกรดเบสนั้นไปมีผลต่อการแตกไอออนของสับสเตรท หรือของโคแฟกเตอร์ ทำให้การจับของสับสเตรทกับเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป (ปราณี, 2547) Whitaker (1994) กล่าวว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่สภาวะที่เหมาะสมอาจเกิดจากการที่โครงสร้างในสภาวะนั้นเอื้อต่อการจับตัวกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท และสภาวะที่เป็นกรดและเบสสูงยังมีผลในการลดความแข็งแรงของพันธะ electrostatic bonds ส่งผลต่อการแตกไอออนของสับสเตรทหรือของโคแฟกเตอร์ ทำให้การจับของสับสเตรทกับเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป (Vojdani, 1996)

นอกจากปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดเบสที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์แล้ว ยังพบว่า ชนิด ปริมาณและค่ากิจกรรรมของเอนไซม์โปรติเอส รวมทั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่แตกต่างกันนั้นยังเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ชนิดของสัตว์น้ำ เพศ เนื้อเยื่อ ลักษณะการกินอาหาร อุณหภูมิของแหล่งน้ำที่สัตว์อาศัย รวมถึงระยะการลอกคราบอีกด้วย (สุทธวัฒน์, 2548; Ogawa *et al*., 1984a,b; Ferrer *et al*. 1989b,c) โดยเอนไซม์โปรติเอสในเฮพาโทแพนเครียสของกุ้ง red shrimp (*Pleoticus muelleri*) มีค่ากิจกรรมสูงสุดในช่วง postmolt รองลงมาได้แก่ ช่วง premolt และ intermolt ตามลำดับ (Fernandez *et al*., 2001) และการศึกษาของ Ogawa *et al*. (1984a) พบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้จากเปลือกที่หุ้มบริเวณหัวและอกของกุ้งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ ส่วนหลัง คิวติเคิลบริเวณท้อง และคิวติเคิลบริเวณขาเดิน ตามลำดับ โดยในส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อต่างกันให้ค่ากิจกรรมที่มากน้อยต่างกันนั้นเป็นผลมาจากปริมาณสับสเตรทและปริมาณเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อแต่ละส่วนมีความแตกต่างกันนั่นเอง (Simpson *et al*., 1987)

3. ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารเคมีในการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลออกซิเดสในปูนิ่มที่เก็บรักษาโดยใช้น้ำแข็ง

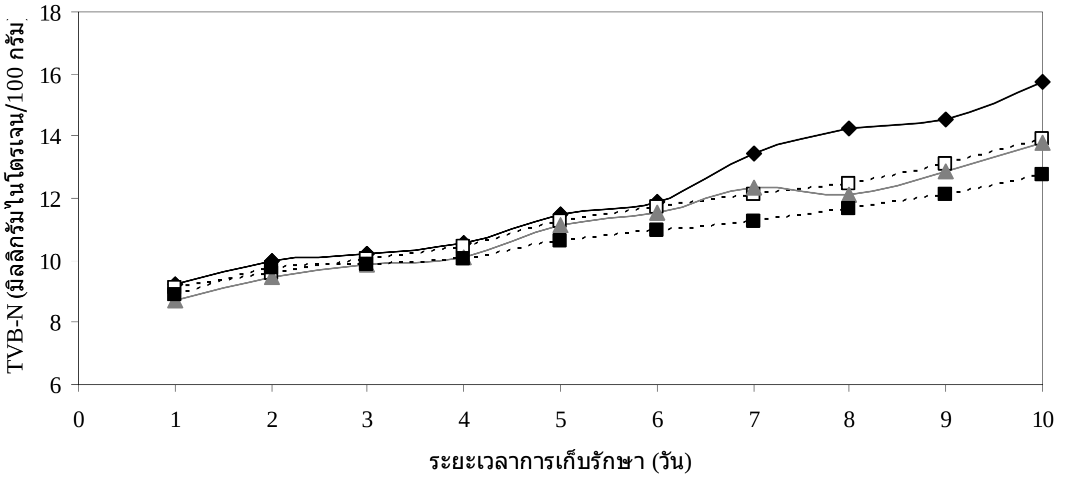
3.1 การทดลองหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแช่ปูนิ่ม

จากผลการทดลองในข้อ 2.1.3 และ 2.2.3 ทำให้ทราบว่า EDTA เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งเอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลออกซิเดสในปูนิ่ม จึงเลือกใช้ EDTA ในการแช่ปูนิ่มก่อนจะนำมาเก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง

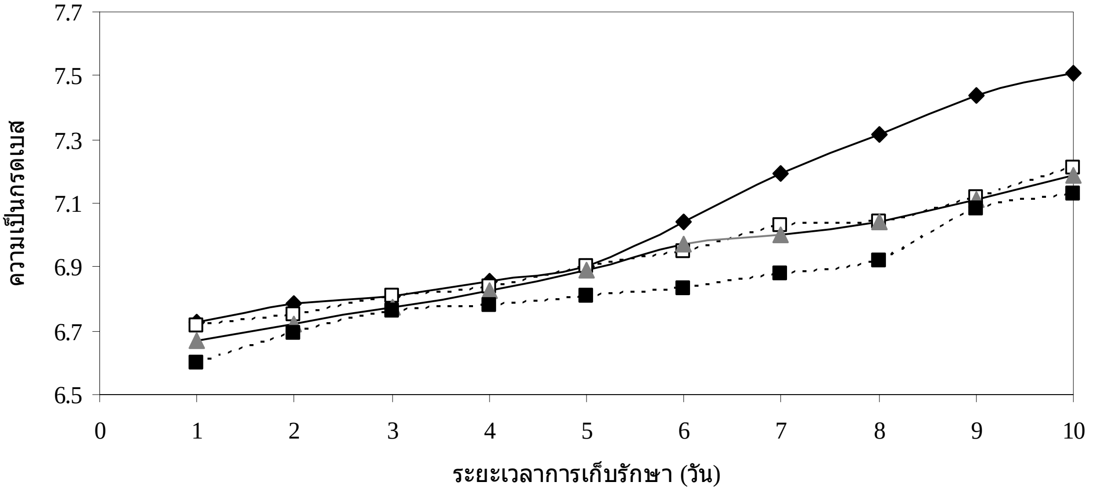
3.1.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ผลของค่า TVB-N พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกันมีผลทำให้ค่า TVB-N (ภาพที่ 45) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปูนิ่มที่แช่สาร ละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีค่า TVB-N ต่ำที่สุด รองลงมาได้แก่ ปูนิ่มที่แช่สารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตามลำดับ ทั้งยังพบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า TVB-N เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในทุกตัวอย่าง เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 2 พบว่าเมทาโลโปรติเอส เป็นเอนไซม์หลักที่สกัดได้ในปูนิ่ม ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวจำเป็นต้องมี โคเอนไซม์พวกไอออนของโลหะรวมอยู่ด้วยจึงจะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ซึ่งเป็นสารจับโลหะชนิดหนึ่งนั้น จึงมีผลไปลดโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ถูกชะลอ การย่อยสลายตัวเองและการเปลี่ยนแปลงปริมาณด่างที่ระเหยได้จึงเกิดช้าลงไปด้วย

ผลการวัดค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่ม แสดงให้เห็นว่าการแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกัน ส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรดเบส (ภาพที่ 46) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปูนิ่มที่แช่สารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรดเบสต่ำที่สุด รองลงมาได้แก่ ปูนิ่มที่แช่ EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตามลำดับ ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และ ค่าความเป็นกรดเบสจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองจะสอดคล้องกับค่า TVB-N ที่สูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้นเช่นกัน การที่ค่า TVB-N เพิ่มขึ้นนั้นส่งผลทำให้ความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้น Sikorski *et al*. (1990) กล่าวว่า การที่ค่าความเป็นกรดเบสของสัตว์น้ำเพิ่มขึ้นภายหลังการตายนั้นเกิดจากการสลายตัวของสารประกอบไนโตรเจนที่มีในตัวสัตว์น้ำนั่นเอง ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chiou and Huang (2004) ที่พบว่าค่าความเป็นกรดเบสและค่า TVB-N ของปูทะเลมีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา



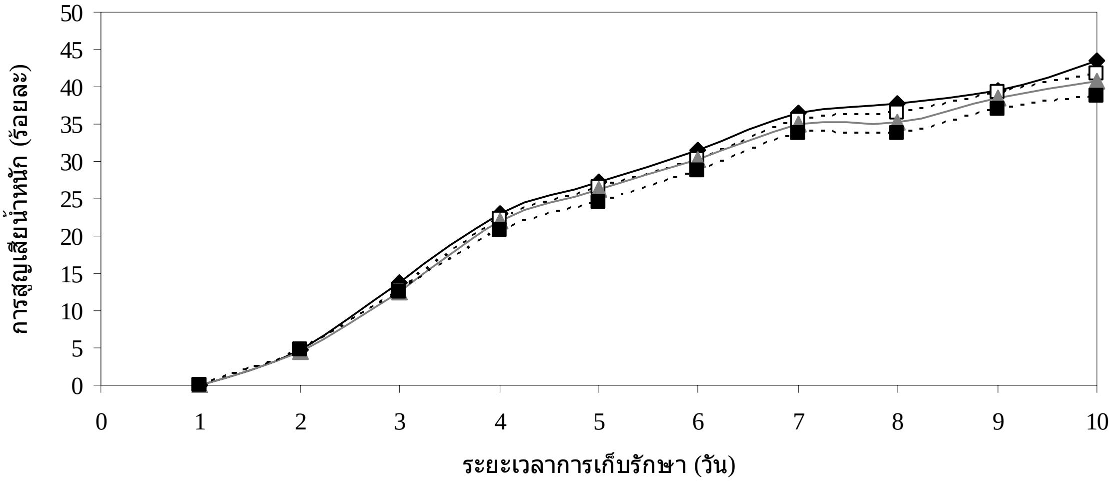
ภาพที่ 45 การเปลี่ยนแปลงค่า TVB-N ของปูนิ่ม ที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน
—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 46 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่ม ที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน
—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

3.1.2 การวิเคราะห์คุณภาพกายภาพ

ผลการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่ม พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA มีปฏิสัมพันธ์ กับระยะเวลาในการเก็บรักษา และการแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้ค่าการสูญเสียน้ำหนัก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.05$) โดยการสูญเสียน้ำหนักของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีค่าต่ำที่สุดรองลงมาได้แก่ ปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตามลำดับ ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และการสูญเสียน้ำหนัก จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 47) ทั้งนี้เนื่องจาก EDTA สามารถจับกับไอออนของโลหะพวกไดแวเลนต์ หรือพวกที่มีเลขออกซิเดชั่นสูงกว่าสองได้ และในการทดลองนี้พบว่า กลุ่มเอนไซม์หลักที่สกัดได้ คือ เมทาโลโปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีไอออนของโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ที่อยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ และเมื่อไอออนของโลหะถูกจับโดยสารจับไอออนโลหะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถนำไอออนนั้นมาใช้ได้ ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้ง (Tsuchiya *et al*., 1994) การย่อยสลายของโปรตีนเกิดช้าลง ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนในปูนิ่มจึงค่อย ๆ ลดลงในอัตราที่ช้า การสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA จึงน้อยกว่าตัวอย่างปูนิ่มที่แช่ในน้ำเย็น



ภาพที่ 47 การเปลี่ยนแปลงค่าการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่ม ที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

ลักษณะเนื้อสัมผัส

ลักษณะเนื้อสัมผัสของสัตว์น้ำสามารถบ่งบอกถึงการเสื่อมเสียได้ โดยเมื่อเกิดการเน่าเสียจะทำให้เนื้อสัมผัสนิ่มและเนื่องจากเกิดการย่อยสลายของโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในกล้ามเนื้อของสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียน คือ คอลลาเจน (Yoshinaka *et al.*, 1989) ใน krill และกุ้ง พบว่า โปรติโอไลติกเอนไซม์ที่มีบทบาทในการสูญเสียเนื้อสัมผัส คือ คอลลาจิเนส (Ooizumi *et al.*, 1983; Haard, 1994)

Mizuta *et al.* (2001) พบว่าลักษณะกล้ามเนื้อของสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียนนั้นมีความสัมพันธ์กับการกระบวนการลอกคราบ และการดูดซึมน้ำภายในเนื้อเยื่อ ซึ่งในช่วงลอกคราบของปูนั้น น้ำจะถูกดึงเข้าสู่ตัวปูอย่างรวดเร็วเพื่อทำให้เปลือกเก่าปริออก ทำให้ภายในกล้ามเนื้อของปูช่วงหลังลอกคราบใหม่ๆ มีปริมาณความชื้นสูง ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อของปูนิ่มจึงมีความชุ่มฉ่ำ (juicy) ความเค็ม และความแน่นเนื้อ (firmness) จึงแตกต่างจากปกติ (Mizuta *et al.*, 1994) นอกจากนี้สัตว์แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างกล้ามเนื้อที่แตกต่างกัน โดยกล้ามเนื้อของปูมีความยืดหยุ่นเพียงเล็กน้อย แตกต่างจากในกุ้งซึ่งยืดหยุ่นมากกว่า เนื่องจากคอลลาเจนในกล้ามเนื้อกุ้งเกิดการ crosslinking ได้มากกว่า อีกทั้งคอลลาจีเนสในกุ้งทนต่ออุณหภูมิสูงกว่าด้วย (Sivakuma *et al.*, 2000) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองทางประสาทสัมผัสในด้านเนื้อสัมผัสจะเห็นได้ว่าแนวโน้มของคะแนนการยอมรับในด้านเนื้อสัมผัสของเนื้อปูนิ่มลดลง ตามการเสื่อมเสียที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่การวัดค่าเนื้อสัมผัสทางกายภาพไม่ว่าจะเป็น ความแข็ง (hardness) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงลักษณะความนุ่ม แข็ง และกระด้าง ค่าการยึดเกาะติดกัน (adhesiveness) ค่าความหยุ่น (springiness) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงลักษณะความยืดหยุ่น ค่าความสามารถเกาะรวมตัวกัน (cohesiveness) แสดงลักษณะความเหนียว เละ ค่าการทนต่อการเคี้ยว (chewiness) บอกลักษณะผสมระหว่างความเหนียวและความยืดหยุ่น ใช้วัดความเปื่อย นุ่มเหนียวและเหนียวแข็ง ค่าความเหนียว (gumminess) ซึ่งเป็นลักษณะผสมระหว่างความแข็งและความสามารถเกาะรวมตัวกัน ใช้บอกลักษณะความเป็นแป้งเหมือนยางหรือกาว (Friedman *et al.*, 1963; Bourne, 1978) พบว่า ไม่มีค่าเฉลี่ยของค่าเนื้อสัมผัสค่าใดที่มีแนวโน้มที่แน่นอน ซึ่งแสดงผลดังภาพผนวกที่ ค 1- ค 6 ดังนั้น ค่าลักษณะเนื้อสัมผัสที่วัดจากเครื่องวัดเนื้อสัมผัสจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นข้อมูลในการบ่งบอกความสดของปูนิ่มได้

การวัดค่าสี (L* a* b*)

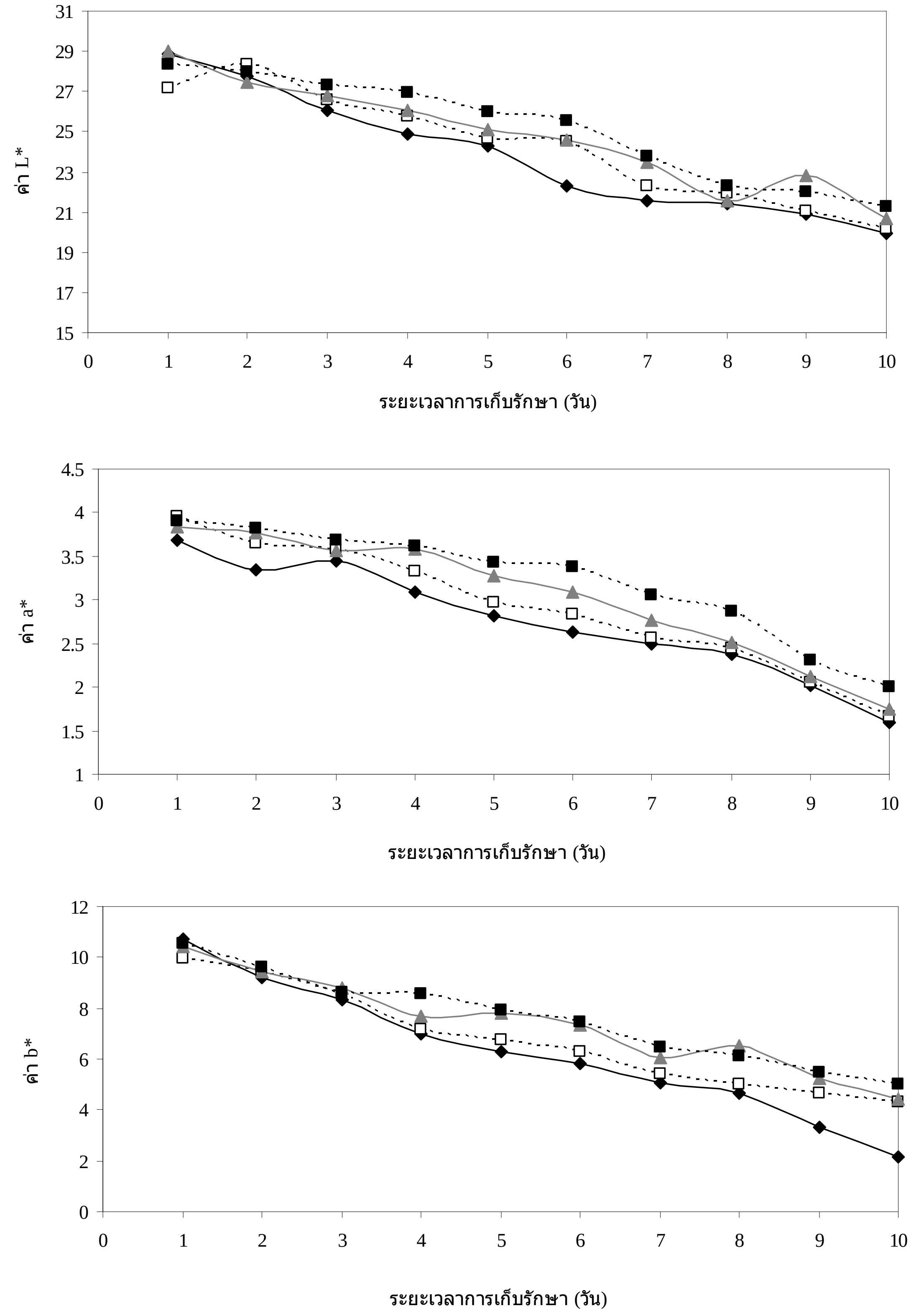
ผลการวัดค่า L* (ค่าความสว่าง มีค่าตั้งแต่ 100 =สีขาว ถึง 0 =สีดำ) a* (ค่าความเป็นสีแดงและสีเขียว เมื่อค่า a* เป็นบวกจะเป็นสีแดง ค่า a* เป็นศูนย์สีเทา และค่าเป็นลบจะเป็นสีเขียว) และ b* (ค่าความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน เมื่อค่า b* เป็นบวกจะเป็นสีเหลือง ค่า b* เป็นศูนย์สีเทา และค่าเป็นลบจะเป็นสีน้ำเงิน) ของทั้งปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งสุก พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA ไม่มีปฏิสัมพันธ์ กับระยะเวลาในการเก็บรักษา และการแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้ค่า L* a* และ b* ที่วัดได้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และจะมีค่าลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เช่นกัน

ผลการวัดค่า L* ของปูนิ่มสด พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้ค่า L* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยค่า L* ของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีค่าสูงที่สุดรองลงมาได้แก่ ปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตามลำดับ ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และค่า L* จะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 48) ซึ่งแสดงว่าปูมีสีคล้ำขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้นานขึ้น และความเข้มข้นของสารละลาย EDTA ที่สูงขึ้น มีผลในการทำให้สีคล้ำน้อยลง

ผลการวัดค่า a* และ b* ของปูนิ่มสด พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้ทั้งค่า a* และ b* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่าทั้ง a* และ b* แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม โดยทั้งค่า a* และ b* ของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ มีค่าใกล้เคียงกันแต่มีค่าสูงกว่าปูนิ่มแช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และค่า a* และ b* จะลดลงตามระยะ เวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน (ภาพที่ 48)

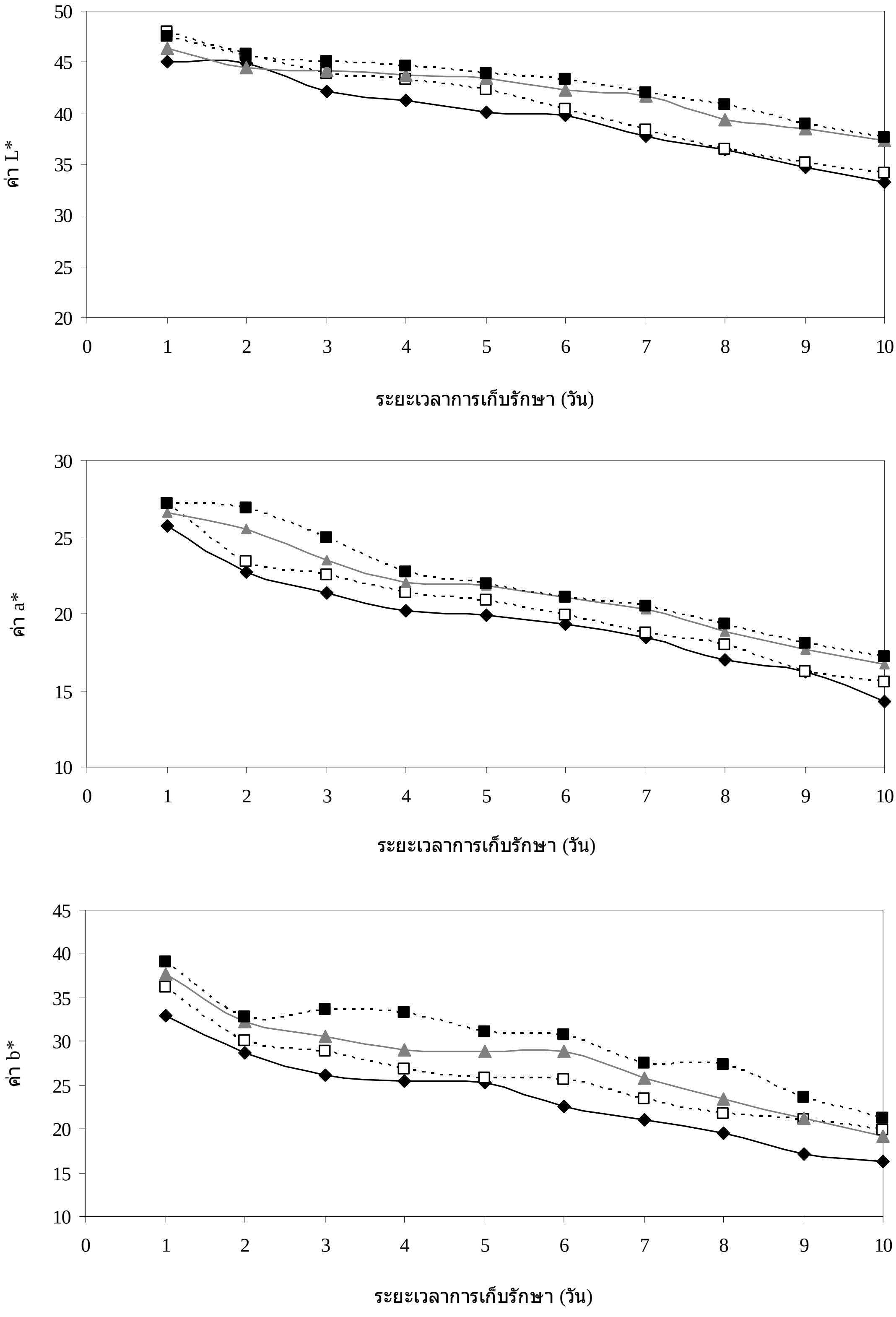
ผลการวัดค่า L* ของปูนิ่มนึ่ง พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้ค่า L* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยค่า L* ของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีค่า L* ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม โดยค่า L* ของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ มีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าสูงกว่าปูนิ่มแช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และค่า L* จะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 49) ส่วนผลการวัดค่า a* และ b* ของปูนิ่มนึ่ง พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้ค่า a* และ b* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยทั้งค่า a* และ b* ของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีค่าสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ ปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตามลำดับ ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา รวมทั้งค่า a*และ b* จะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน (ภาพที่ 49)

เมื่อพิจารณาค่าสีทั้งหมดของทั้งปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่ง จะเห็นได้ว่าเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ปูนิ่มมีค่า L* a* และ b* ลดลง แสดงว่า ปูนิ่มมีสีคล้ำมากขึ้น ทั้งนี้การเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (Simpson *et al*., 1987) และเมื่อนำปูนิ่มมาแช่ในสารละลาย EDTA ที่มีสมบัติในการจับโลหะทองแดง ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (Zawistowski *et al*., 1991) จึงสามารถชะลอกิจกรรมของเอนไซม์ ทำให้การเกิดสีคล้ำในปูนิ่มช้าลงได้ โดยความเข้มข้นของสารละลาย EDTA ที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดคือ 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 48 การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* a* b* ของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ 40 มิลลิโมลาร์

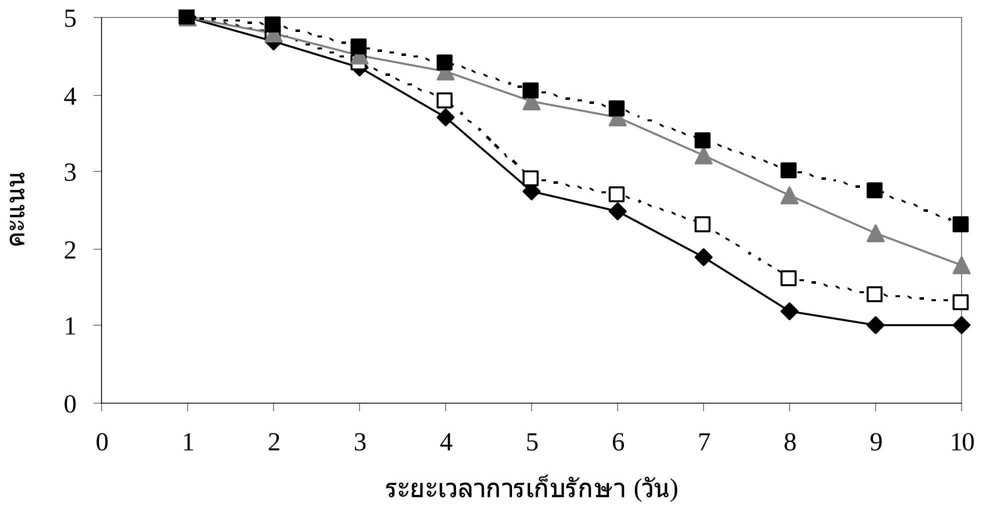


ภาพที่ 49 การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* a* b* ของปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

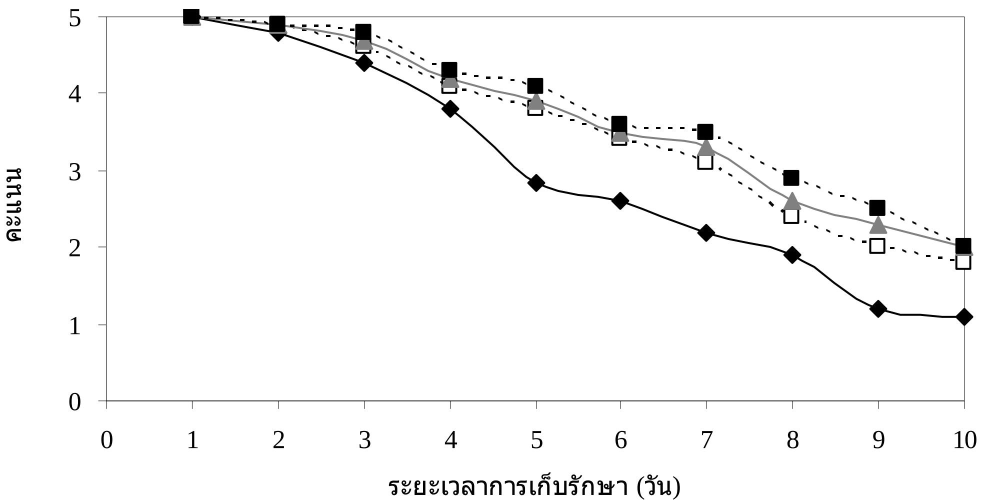
3.1.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผลการให้คะแนนตามเกณฑ์การให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพของปูนิ่มสดทั้งในส่วนที่เป็นกระดองและลำตัว (ภาพที่ 50) คะแนนของกลิ่น (ภาพที่ 51) รวมถึงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพของปูนิ่มนึ่งทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อปู (ภาพที่ 52) และคะแนนของกลิ่น (ภาพที่ 53) พบว่าความเข้มข้นของ EDTA ที่ต่างกันให้ค่าคะแนนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ ให้คะแนนสูงกว่าการแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 30 และ 20 มิลลิโมลาร์ ตลอดช่วงเวลาการเก็บรักษา



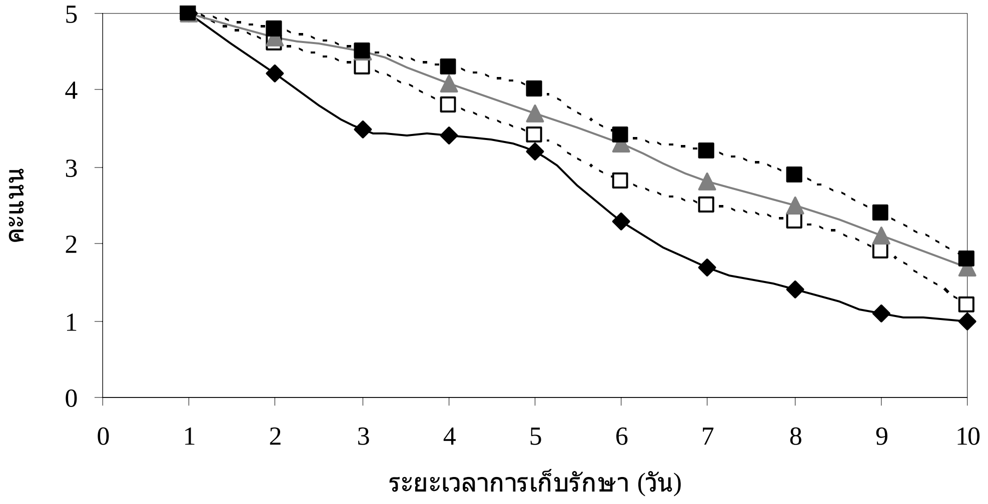
ภาพที่ 50 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกระดองและลำตัวของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์



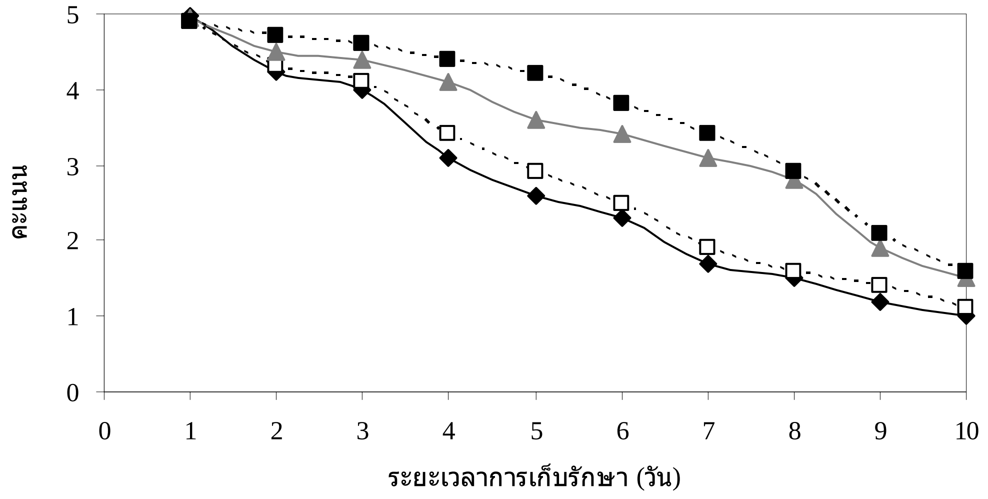
ภาพที่ 51 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 52 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ 40 มิลลิโมลาร์

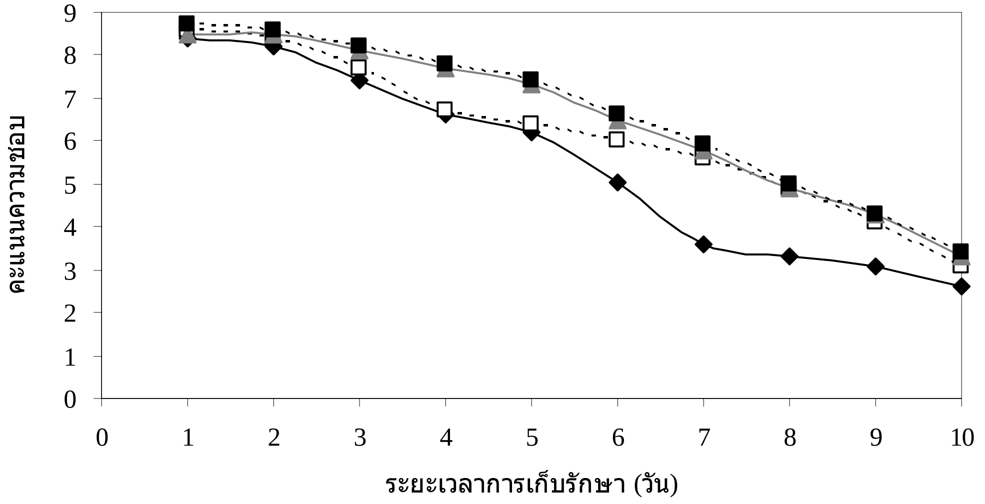


ภาพที่ 53 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ 40 มิลลิโมลาร์

การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดในทุกคุณลักษณะ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA มีปฏิสัมพันธ์ กับระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ สูงที่สุดรองลงมาได้แก่ ปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตามลำดับ ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น

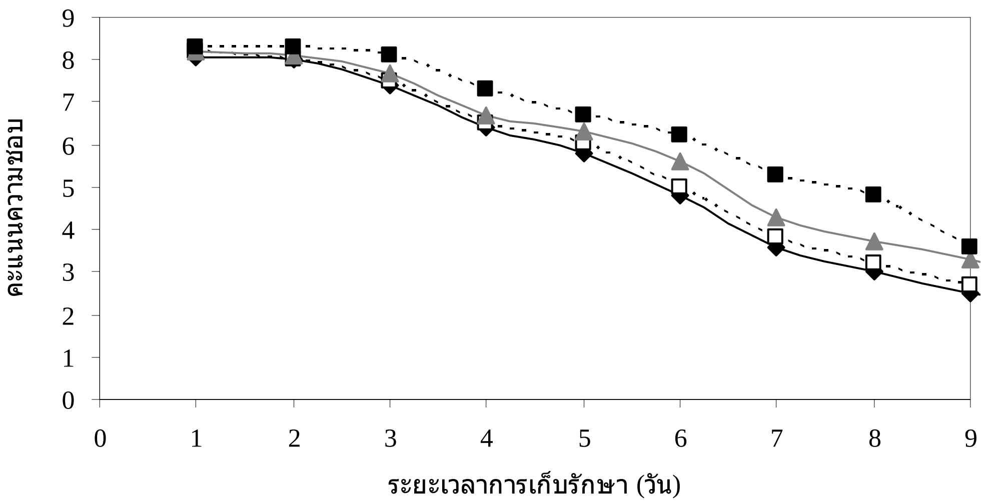
การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดด้านลักษณะปรากฏ พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้คะแนนความชอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ ใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าปูนิ่มแช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40, 30 และ 20 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 8 ส่วนตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 6 (ภาพที่ 54)



ภาพที่ 54 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

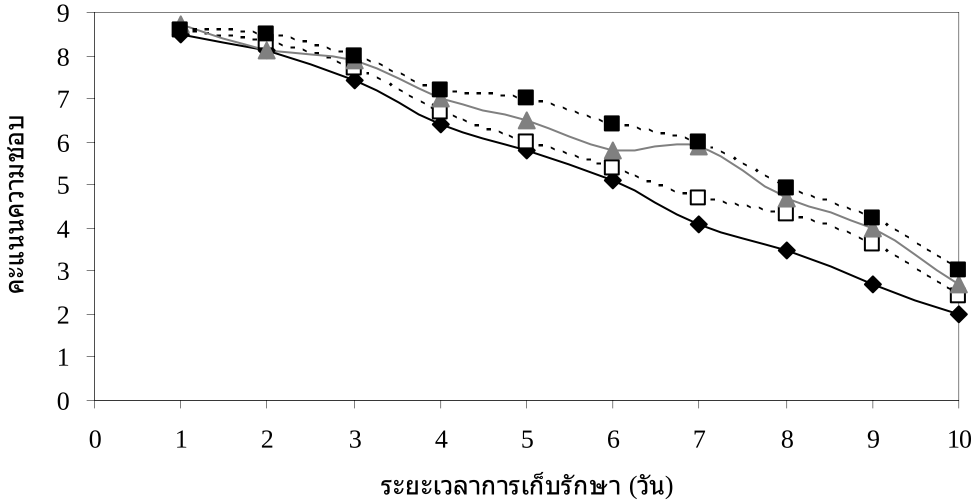
การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดด้านสีกระดอง พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ กับตัวอย่างควบคุม มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤ 0.05) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูที่แช่ในสาร ละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มากที่สุด รองลงมาได้แก่ 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 8 ส่วนปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 6 (ภาพที่ 55)



ภาพที่ 55 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีกระดองของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

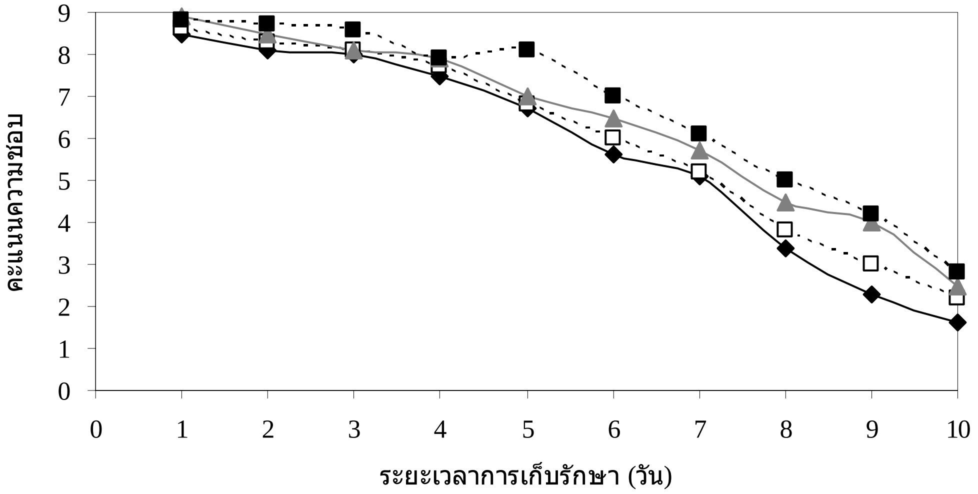
การทดสอบความชอบของปูนิ่มสด โดยดูจากสีเปลือกด้านท้อง พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ ใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาปูนิ่มที่แช่ EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 8 ส่วนปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 6 (ภาพที่ 56)



ภาพที่ 56 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีเปลือกด้านท้องของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

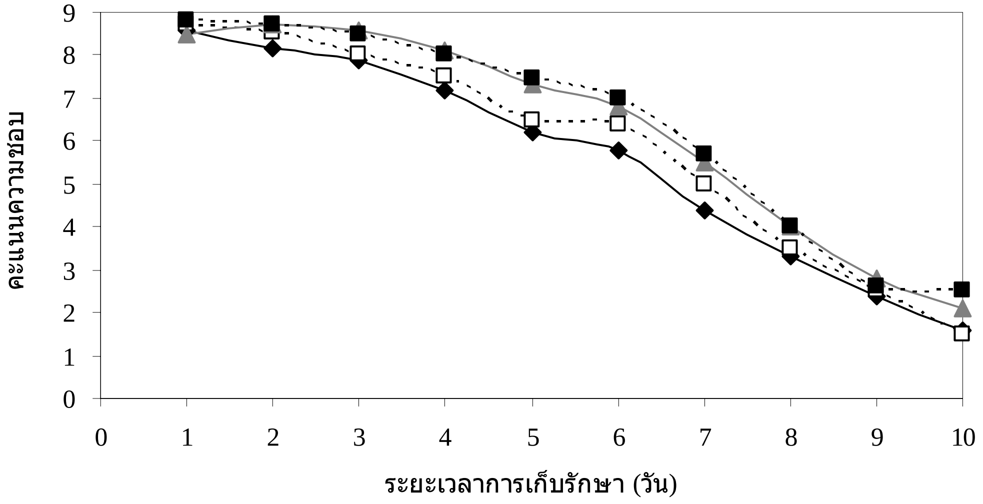
การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดด้านกลิ่น พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้นต่างกันมีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ สูงสุด รองลงมาได้แก่ 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะ เวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาปูนิ่มที่แช่ EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 8 ส่วนปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 7 (ภาพที่ 57)



ภาพที่ 57 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น -- 20 มิลลิโมลาร์ — 30 มิลลิโมลาร์ -- 40 มิลลิโมลาร์

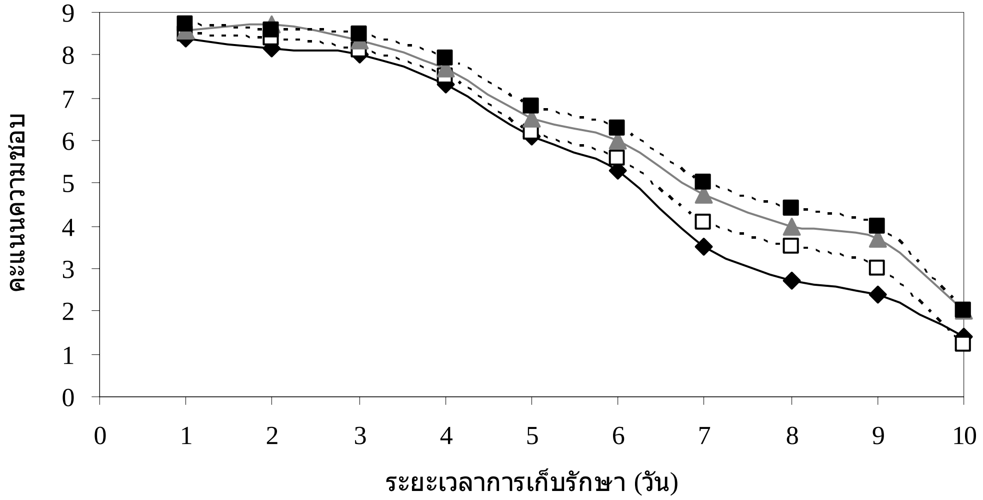
การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดด้านเนื้อสัมผัส พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ ใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าปูนิ่มแช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาปูนิ่มที่แช่ EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 4) ในวันที่ 8 ส่วนปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 7 (ภาพที่ 58)



ภาพที่ 58 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

การทดสอบความชอบปูนิ่มสด ด้านความชอบรวม พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบรวมของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ สูงสุด รองลงมาได้แก่ 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบรวมจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษา ปูนิ่มที่แช่ EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนความชอบรวมใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 8 ส่วนปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30 และ 20 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 7 ซึ่งต่างจากตัวอย่างควบคุมที่มีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ในวันที่ 6 (ภาพที่ 59)



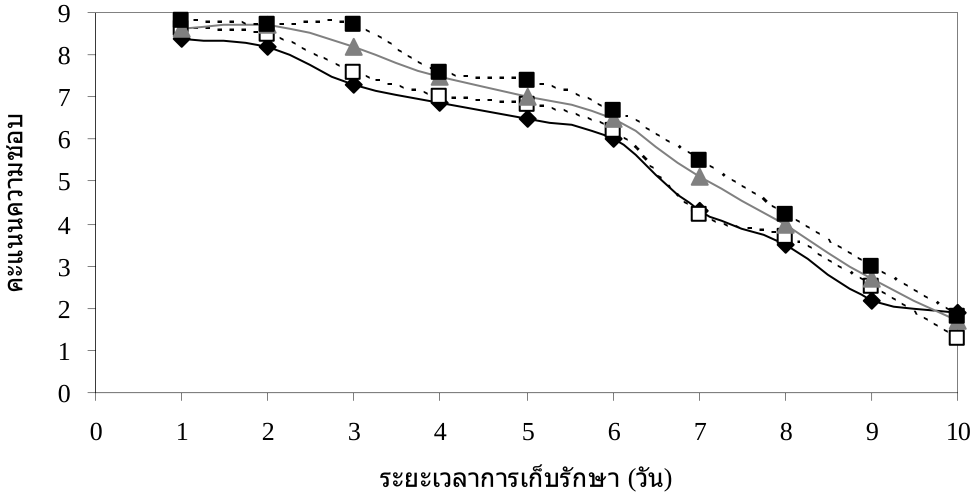
ภาพที่ 59 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ 40 มิลลิโมลาร์

การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งในทุกคุณลักษณะ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA มีปฏิสัมพันธ์ กับระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตามลำดับ ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น

การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านลักษณะปรากฏ พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ กับตัวอย่างควบคุม มีคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ ของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ สูงสุด รองลงมาได้แก่ ปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะ เวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษา ปูนิ่มที่แช่ EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนด้านลักษณะปรากฏ ใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ =

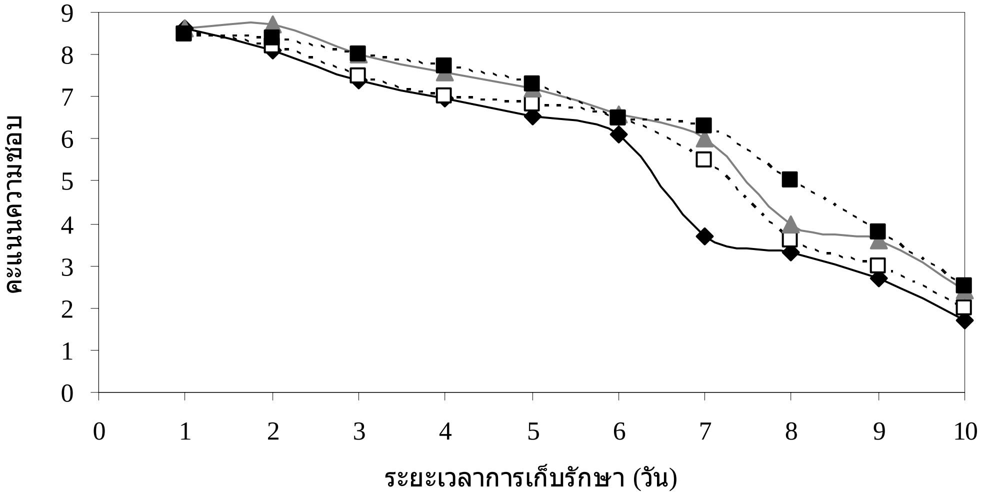
5) ในวันที่ 7 ขณะที่ในวันเดียวกันปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 4) (ภาพที่ 60)



ภาพที่ 60 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

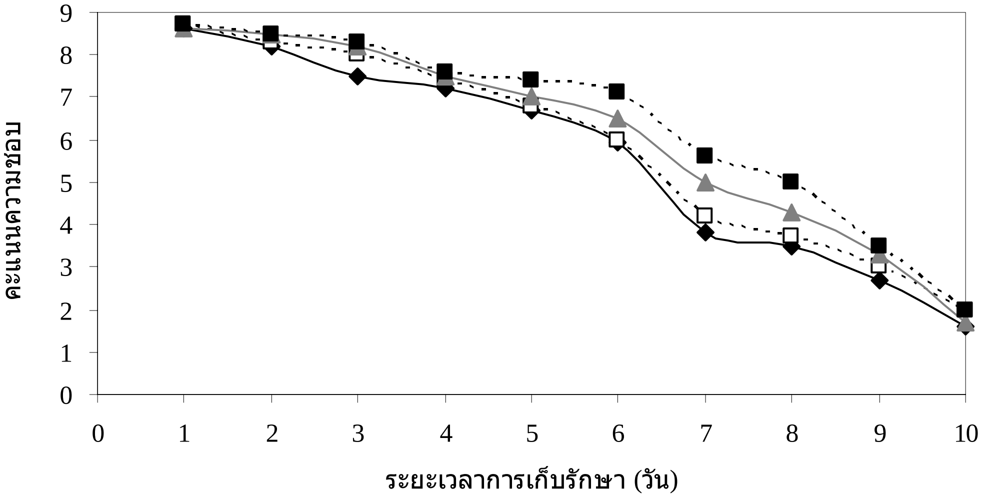
—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านสี (ภาพที่ 61) รสชาติ (ภาพที่ 62) และเนื้อสัมผัสของเนื้อปู (ภาพที่ 63) พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30 และ40 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบด้านสี รสชาติ และเนื้อสัมผัส ต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ กับตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบด้านสี รสชาติ และเนื้อสัมผัส ของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ สูงสุด รองลงมาได้แก่ ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษา ปูนิ่มที่แช่ EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนความชอบด้านสี รสชาติ และเนื้อสัมผัส ใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนด้านสี รสชาติ และเนื้อสัมผัส อยู่ในช่วงเฉย ๆ ถึงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 5-4) ในวันที่ 8 ขณะที่ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวในวันที่ 7



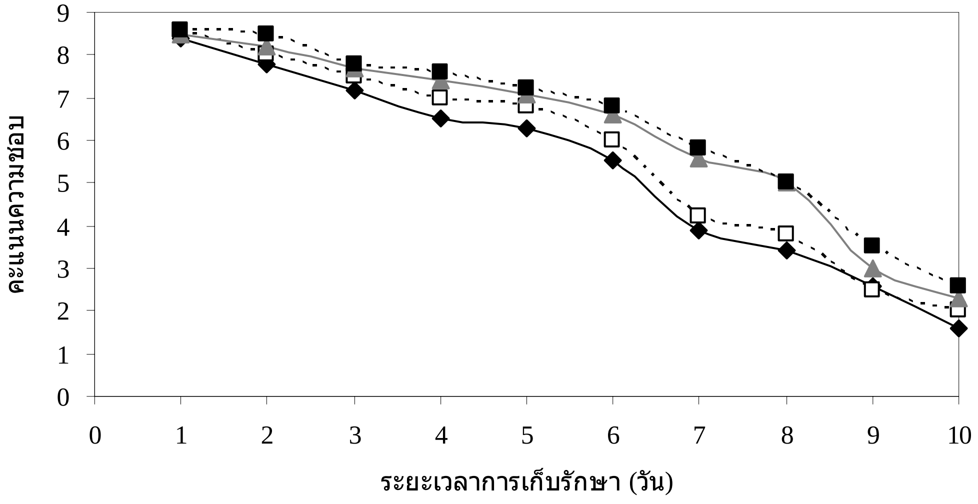
ภาพที่ 61 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 62 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรสชาติของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

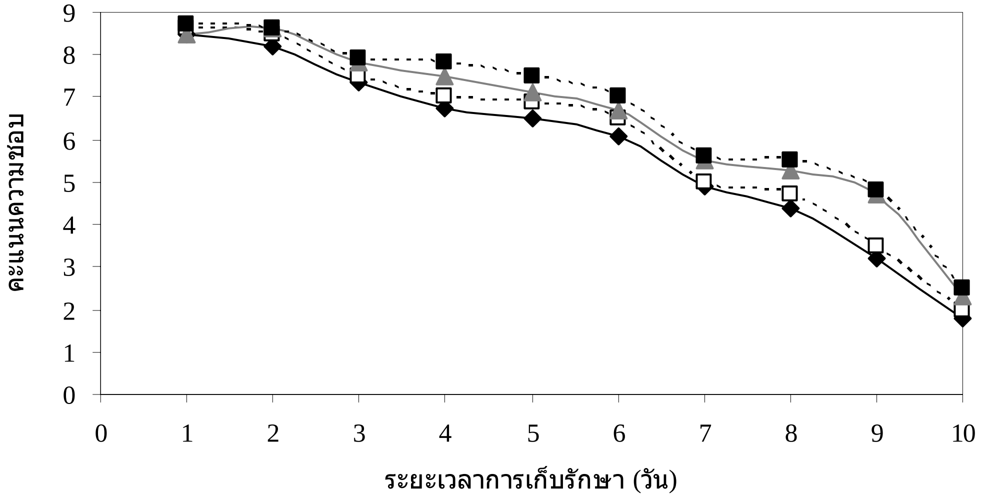
น้ำเย็น 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 63 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ 40 มิลลิโมลาร์

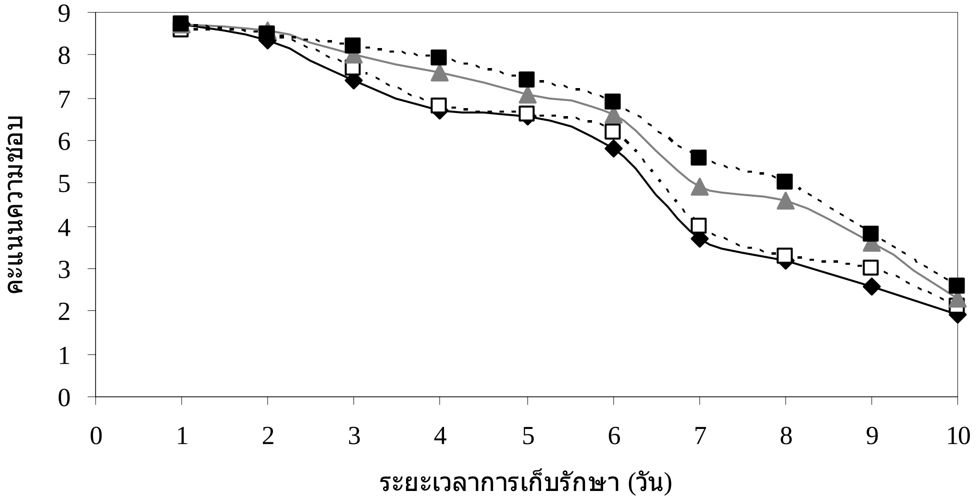
การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านกลิ่นของเนื้อปู (ภาพที่ 64) พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบด้านกลิ่นต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ กับตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบด้านกลิ่นของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ สูงสุด รองลงมาได้แก่ ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบด้านกลิ่นจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษา ปูนิ่มที่แช่ EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนความชอบด้านกลิ่นใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 9 ขณะที่ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวในวันที่ 7 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับคะแนนความชอบด้านกลิ่นของปูนิ่มสดในวันเดียวกันจะได้คะแนนความชอบอยู่ในช่วงไม่ชอบปานกลางถึงไม่ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 3-2) ก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องจากในการทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งนั้นมีการใช้ความร้อนในการเตรียมตัวอย่าง กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ จึงระเหยไปพร้อมกับไอน้ำ ทำให้คะแนนความชอบของกลิ่นเนื้อปูสุกที่ได้สูงกว่าในปูนิ่มสด



ภาพที่ 64 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านความชอบรวม (ภาพที่ 65) พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบรวม ต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05) เช่นเดียวกับ ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ กับตัวอย่างควบคุม แต่คะแนนความชอบรวม ระหว่างกลุ่มแรก คือ ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ กับ กลุ่มที่สอง คือ ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุมมีคะแนนความชอบรวม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤ 0.05) โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบรวมของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ สูงสุด รองลงมาได้แก่ ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 30, 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตามลำดับ ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบรวมจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาปูนิ่มที่แช่ EDTA ทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 และ 30 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ถึงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 5-4) ในวันที่ 8 ขณะที่ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวในวันที่ 7 ซึ่งในวันเดียวกันพบว่า ตัวอย่างควบคุมมีคะแนนความชอบรวมอยู่ในช่วงไม่ชอบเล็กน้อยถึงไม่ชอบปานกลาง (คะแนนความชอบ = 4-3)



ภาพที่ 65 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์

เมื่อพิจารณาคะแนนความชอบโดยรวมของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่ง จะเห็นได้ว่า คะแนนความชอบของปูนิ่มนึ่งในทุกคุณลักษณะมีคะแนนสูงกว่าในปูนิ่มสด ทั้งนี้อาจเกิดจากการเตรียมตัวอย่างในการทดสอบแตกต่างกัน โดยปูนิ่มนึ่งจะใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อปูในการทดสอบ อีกทั้งมีการให้ความร้อนกับตัวอย่างทำให้คะแนนความชอบของปูนิ่มนึ่งสูงกว่าปูนิ่มสด

ลักษณะปรากฏของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่ง ในช่วงต้นของการเก็บรักษานั้น เห็นได้ว่า กระดองติดแน่นกับลำตัว ผิวกระดองเรียบตึง ไม่มีน้ำซึมออกมาจากตัวปูนิ่มสด และเมื่อนำไปนึ่งเนื้อปูจะเป็นก้อนสีขาว ชุ่มน้ำ เนื้อเป็นมัน เนื่องจากยังเป็นช่วงเริ่มต้นของการย่อยสลายตัวเอง อันเป็นผลของปฏิกิริยาของเอนไซม์ในตัวปูนิ่ม โปรตีนยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ความสามารถในการจับกับโมเลกุลของน้ำยังคงมีอยู่สูง แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น จะเห็นว่า กระดองจะแยกออกจากลำตัว ผิวกระดองย่น มีน้ำไหลออกมาจากตัวปูมากขึ้น และเนื้อปูที่เคยจับกันเป็นก้อนจะเริ่มแยกออกจากกัน อย่างไรก็ตามการแช่ปูนิ่มลงในสารละลาย EDTA สามารถช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ เนื่องจากไอออนของโลหะที่มีการสะสมไว้ในตัวปูระหว่างกระบวนการลอกคราบ เพื่อช่วยในการสร้างความแข็งแรงให้กระดองนั้น (Kuballa and Elizur, 2007) ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในการเข้าทำปฏิกิริยาของเมทาโลโปติเอส ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์หลักที่สกัดได้จากปูนิ่มในการทดลองนี้ ถูกจับไว้ด้วย EDTA ที่มีคุณสมบัติในการจับโลหะ

จึงมีผลไปลดปริมาณโคแฟกเตอร์ ทำให้กิจกรรมของเมทาโลโปรติเอสถูกชะลอ การย่อยสลายตัวเองจึงเกิดช้าลงด้วย

ในส่วนของสีปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งนั้น การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA มีผลทำให้การเกิดสีคล้ำลดลง เนื่องจาก EDTA มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะได้สูง จึงไปจับกับทองแดงที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ทำให้เอนไซม์ไม่อยู่ในรูปที่เหมาะสมในการเกิด ปฏิกิริยากับสับสเตรท ซึ่งก็คือ สารสีน้ำตาลที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาจึงเกิดช้าลงด้วย (Zawistowski *et al*., 1991) และเมื่อพิจารณา ค่าสี L* a* และ b* ซึ่งมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานั้น พบว่า มีความสัมพันธ์กับคะแนนความชอบด้านสีของปูนิ่มสด โดยมีค่า correlation coefficient (r^2) เท่ากับ 0.9554, 0.9423 และ 0.9188 ตามลำดับ เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ในปูนิ่มสุก มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9019, 0.8660 และ 0.8680 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อปูนิ่มมีสีคล้ำลงจะทำให้ความชอบของผู้ทดสอบลงลง Benjakul *et al*. (2005) กล่าวว่า สีของกุ้งเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญต่อการการยอมรับของผู้บริโภคเช่นกัน

เนื้อสัมผัสของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งนั้น เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น จะมีลักษณะนิ่มเละ ขาดความยืดหยุ่น ไม่เป็นเส้นใย เนื้อเป็นแป้ง ซึ่งการสูญเสียเนื้อสัมผัสในลักษณะดังกล่าว เป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สูงขึ้น การย่อยสลายโปรตีนสูงทำให้โปรตีนสูญเสียโครงรูป โปรตีนสามารถอุ้มน้ำได้ลดลง อีกทั้งในปูนิ่มนึ่งเมื่อผ่านการให้ความร้อนก็มีผลทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ (Erdogdu *et al*., 2001) ความชุ่มน้ำของเนื้อปูที่ผู้บริโภครับรู้ได้จึงลดลง การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ที่มีคุณสมบัติในการจับโลหะ ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเมทาโลโปรติเอส ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ถูกชะลอ การย่อยสลายตัวเองจึงเกิดช้ากว่าตัวอย่างที่ไม่ได้แช่สารละลาย EDTA

กลิ่นคาวและกลิ่นแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งในปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งนั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจน โดยเกิดจากเอนไซม์ในสัตว์น้ำหรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ทำให้สัตว์น้ำเน่าเสีย ไดเมธิลเอมีน และแอมโมเนีย (สุทธวัฒน์, 2548) การเกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ดังกล่าวจะเกิดขึ้นช้าลงหากมีการแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA ก่อนเนื่องจาก ความสามารถในการชะลอกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการไปจับกับโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ได้ สุทธวัฒน์ (2548) กล่าวว่า สารที่ให้กลิ่นไม่ดีในกุ้งและกุ้งก้ามกราม ได้แก่ สารไตรเมธิลอาซีน (trimethylasine) และบิส-เมธิลไทโอมีเทน (bis-methylthiomethane)

รสชาติของปูนิ่มนึ่งที่ได้รับความชอบจากผู้ทดสอบลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้นนั้น เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเช่นกัน เนื่องจากสารที่ให้รสชาติในสัตว์น้ำเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไปกระตุ้นการรับรสจากกลูตา-มิก Hayashi และคณะ (1981) กล่าวว่า การสร้างรสชาติที่สำคัญของปู snow crab ต้มนั้น เกิดจากกรดอะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ อะลานีน กลูตามิก กลัยซีน และอาร์จินีน โดยที่กรดอะมิโนเหล่านี้จะให้รสหวานและรสอร่อย ซึ่งจะถูกวัดในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid: FFA) เพราะรสชาติที่เกิดจากกรดอะมิโนอิสระจะมีความเข้มกว่ารสชาติที่เกิดจากเปปไทด์ (Hayashi *et al.*, 1981) ดังนั้นการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ ซึ่งก็คือ EDTA จึงมีผลไปลดการสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ และการสลายตัวของโปรตีนในตัวปูนิ่มได้

สำหรับอายุการเก็บรักษาปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน พบว่าอายุการเก็บรักษาของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับตัวอย่างอื่น ๆ ($P \leq 0.05$) นั่นคือสามารถเก็บรักษาได้นาน 8 วัน ส่วนปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ สามารถเก็บรักษาได้ 7 วัน ขณะที่ตัวอย่างควบคุมสามารถเก็บรักษาได้ 6 วัน ซึ่งในการพิจารณาอายุการเก็บรักษานั้น จะใช้คะแนนความชอบของปูนิ่มสดในการพิจารณา เนื่องจากเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคใช้พิจารณาในการเลือกซื้อปูนิ่มที่วางจำหน่ายตามท้องตลาด

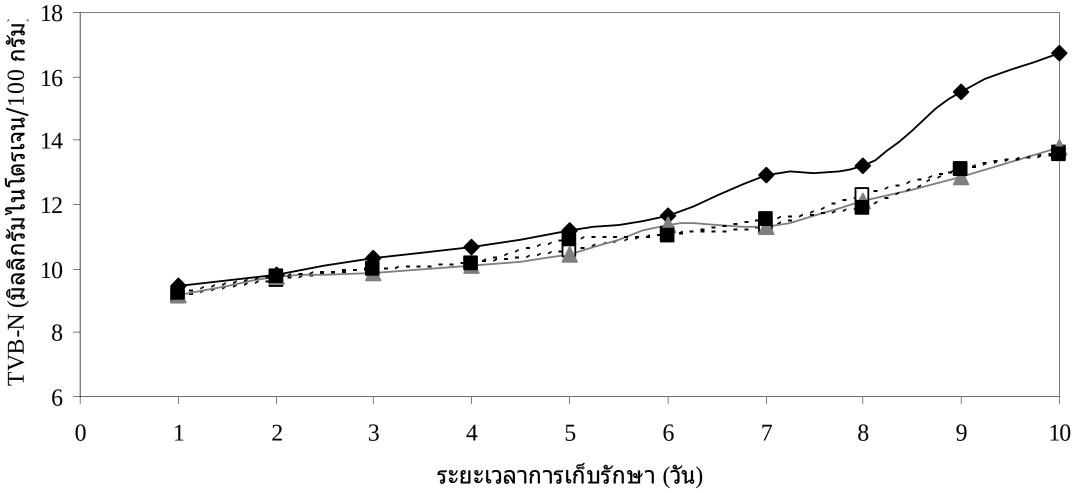
3.2 การทดลองใช้สารละลายผสมยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลออกซิเดส

จากผลการทดลองในข้อ 3.1 ทำให้ทราบว่า เมื่อพิจารณาจากคะแนนความชอบของปูนิ่มสด ซึ่งเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคใช้พิจารณาในการเลือกซื้อปูนิ่มที่วางจำหน่ายตามท้องตลาด จะเห็นได้ว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บรักษาปูนิ่มได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้สารละลาย EDTA ที่มีความเข้มข้นดังกล่าว มาผสมกับโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ ในการแช่ปูนิ่มก่อนจะนำมาเก็บรักษาโดยใช้น้ำผสมน้ำแข็ง

3.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

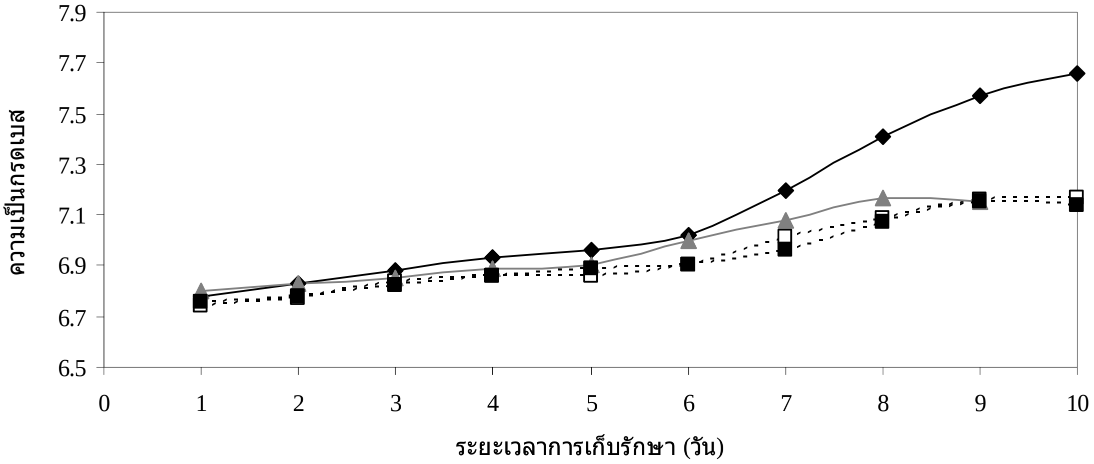
จากการศึกษาชนิดของสารละลายผสม ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแช่ปูนิ่ม เป็นเวลา 10 นาที พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลายต่างๆ ได้แก่ สารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ รวมทั้ง ตัวอย่างปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้ค่า TVB-N (ภาพที่ 66) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีค่า TVB-N แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งยังพบว่าระยะ เวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า TVB-N เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.05$) Barnett (1985) กล่าวว่าไอออนของซัลไฟต์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นสารที่สามารถยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ โดยมีผลต่อการเคลื่อนย้ายโปรตรอนที่เมมเบรนของจุลินทรีย์ (Muller *et al*., 2004) ซึ่งจากสาเหตุดังกล่าวทำให้จุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของด่างที่ระเหยได้ในปริมาณน้อยลงไปด้วย (Karthikeyan *et al*.,1999)

ผลการวัดค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่ม แสดงให้เห็นว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลายต่างๆ ได้แก่ สารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ รวมทั้ง ตัวอย่างปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้ค่าความเป็นกรดเบส (ภาพที่ 67) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P> 0.05$) แต่มีค่าความเป็นกรดเบสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา และค่าความเป็นกรดเบสจะเพิ่ม ขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองจะสอดคล้องกับปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวปูหรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่สูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น



ภาพที่ 66 การเปลี่ยนแปลงค่า TVB-N ของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



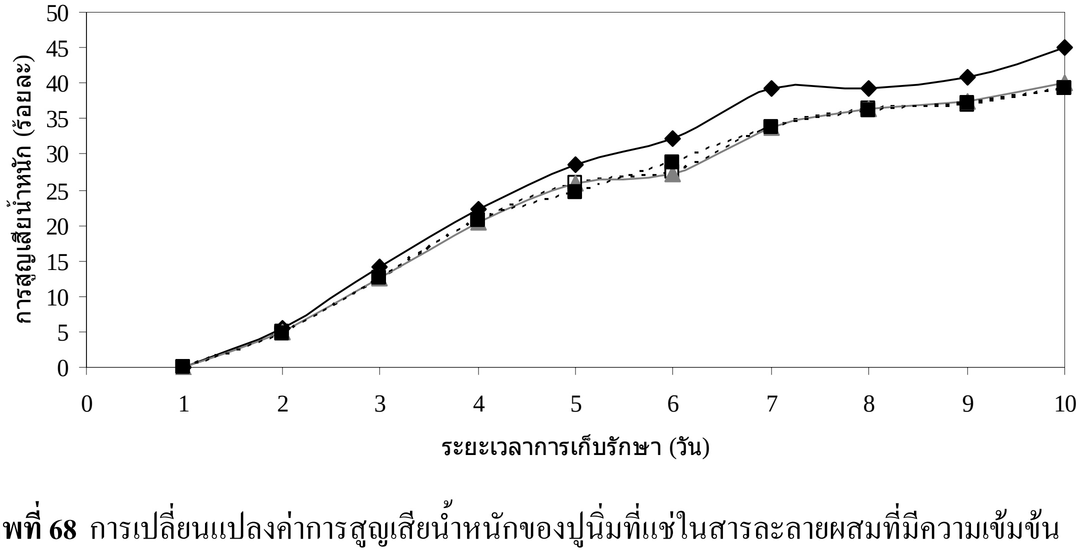
ภาพที่ 67 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

3.2.2 การวิเคราะห์คุณภาพกายภาพ

การแช่ปูนิ่มการแช่ปูนิ่มในสารละลายต่าง ๆ พบว่า การสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มไม่มีปฏิสัมพันธ์ กับระยะเวลาในการเก็บรักษา และการแช่ปูนิ่มในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ รวมทั้ง การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้ค่าการสูญเสียน้ำหนักมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และการสูญเสียน้ำหนักจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 68)

การสลายตัวของโปรตีนเนื่องจากเอนไซม์ทั้งจากตัวปูนิ่มเองและจากจุลินทรีย์ที่มากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ทำให้คุณสมบัติในการอุ้มน้ำของโปรตีนลดลง การสูญเสียน้ำหนักจึงเกิดขึ้นได้มาก โดย EDTA นั้นมีผลในการยับยั้งเอนไซม์โดยตรง ขณะที่โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ไปยั้งยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้ความสามารถในการสร้างเอนไซม์มาย่อยโปรตีนลดลง นอกจาก นี้ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนยังขึ้นอยู่กับ ค่าความเป็นกรดเบส (Offer and Knight, 1988) อีกด้วย



ภาพที่ 68 การเปลี่ยนแปลงค่าการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

ลักษณะเนื้อสัมผัส

เมื่อพิจารณาค่าลักษณะเนื้อสัมผัสของปูนิ่มสุกทุกค่า ไม่ว่าจะเป็น ความแข็ง ค่าการยึดเกาะติดกัน ค่าความหยุ่น ค่าความสามารถเกาะรวมตัวกัน ค่าการทนต่อการเคี้ยว และค่าความเหนียว พบว่า ไม่มีค่าเฉลี่ยของค่าเนื้อสัมผัสค่าใดที่มีแนวโน้มที่แน่นอน ดังผลที่แสดงในภาพผนวกที่ ค7 - ค 12 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน (3.1) ดังนั้น จึงไม่สามารถนำค่าลักษณะเนื้อสัมผัสค่าใดค่าหนึ่งมาใช้เป็นข้อมูลในการบอกถึงความสดของปูนิ่มได้ นอกจากนี้สัตว์แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างกล้ามเนื้อที่แตกต่างกันอีกด้วย (Sivakuma *et al*., 2000) อย่างไรก็ตาม การศึกษาหลายชิ้นบ่งบอกว่า เอนไซม์โปรติเอสที่มีบทบาทสำคัญในการสูญเสียความแน่นเนื้อของ Atlantic cod (Kristjansson *et al*., 1995) fiddler crabs (*Uca pugilator*) (Eisen *et al*., 1973) และ northern shrimps (*Pandalus eous*) (Aoki *et al*., 2004) คือ คอลลาจิเนส

ค่าสี (L* a* b*)

ผลการวัดค่า L* ของปูนิ่มสด พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลายต่างๆ มีปฏิสัมพันธ์ กับระยะเวลาในการเก็บรักษา ในขณะที่ค่า a* และ b* นั้น พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลายต่าง ๆ ไม่มีปฏิสัมพันธ์ กับระยะเวลาในการเก็บรักษา แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งค่า L*, a* และ b* ต่างก็มีค่าลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เหมือนกัน

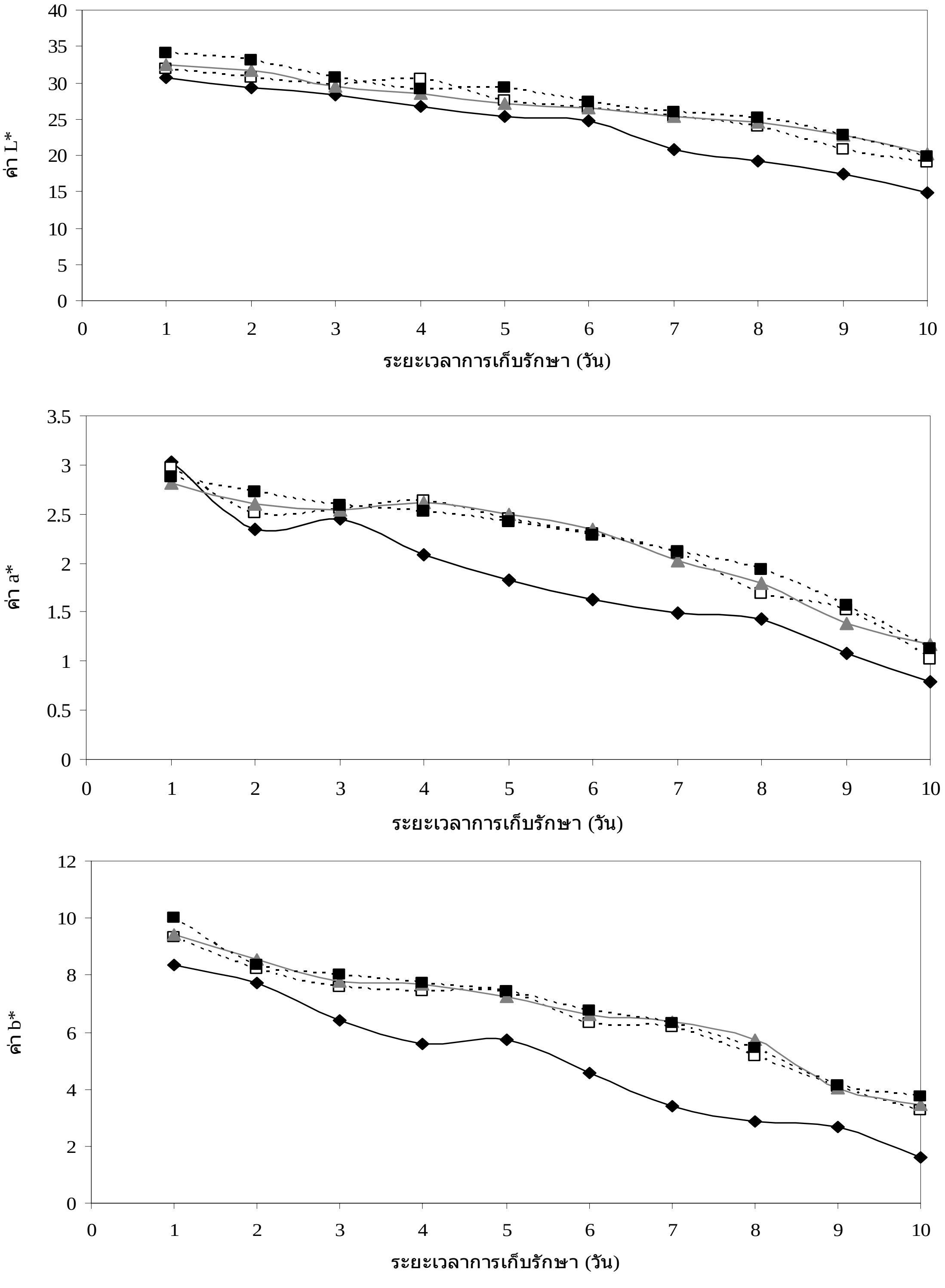
ผลการวัดค่า L* ของปูนิ่มสด พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีค่า L* แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม โดยค่า L* ของปูที่แช่ในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ เท่ากับ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ ใกล้เคียงกัน แต่มีค่าต่ำกว่าปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ตัวอย่างควบคุม จะมีค่า L* ต่ำที่สุดตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และค่า L* จะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 69) โดยโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์นั้นนอกจากจะเป็นสารรีดิวซิ่งแล้ว ยังมีคุณสมบัติในการฟอกสีด้วย ทำให้ปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่มีโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์อยู่ด้วยนั้น มีค่า L* สูงกว่าตัวอย่างควบคุม

สอดคล้องกับการศึกษาของ Martinez-Alvarez *et al.* (2007) ที่พบว่า กุ้ง Norway lobsters ที่แช่ในสารละลายซัลไฟต์ ร้อยละ13 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส มีค่า L* สูงกว่ากุ้งที่ไม่ผ่านการแช่สารละลายซัลไฟต์

ผลการวัดค่า a* และ b* ของปูนิ่มสด พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ เท่ากับ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ และ การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ ให้ทั้งค่า a* และ b* แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม โดยทั้งค่า a* และ b* ของปูที่แช่ในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ รวมทั้งสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีค่าใกล้เคียงกัน แต่มีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และทั้งค่า a* และ b* จะลดลงตามระยะ เวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 69)

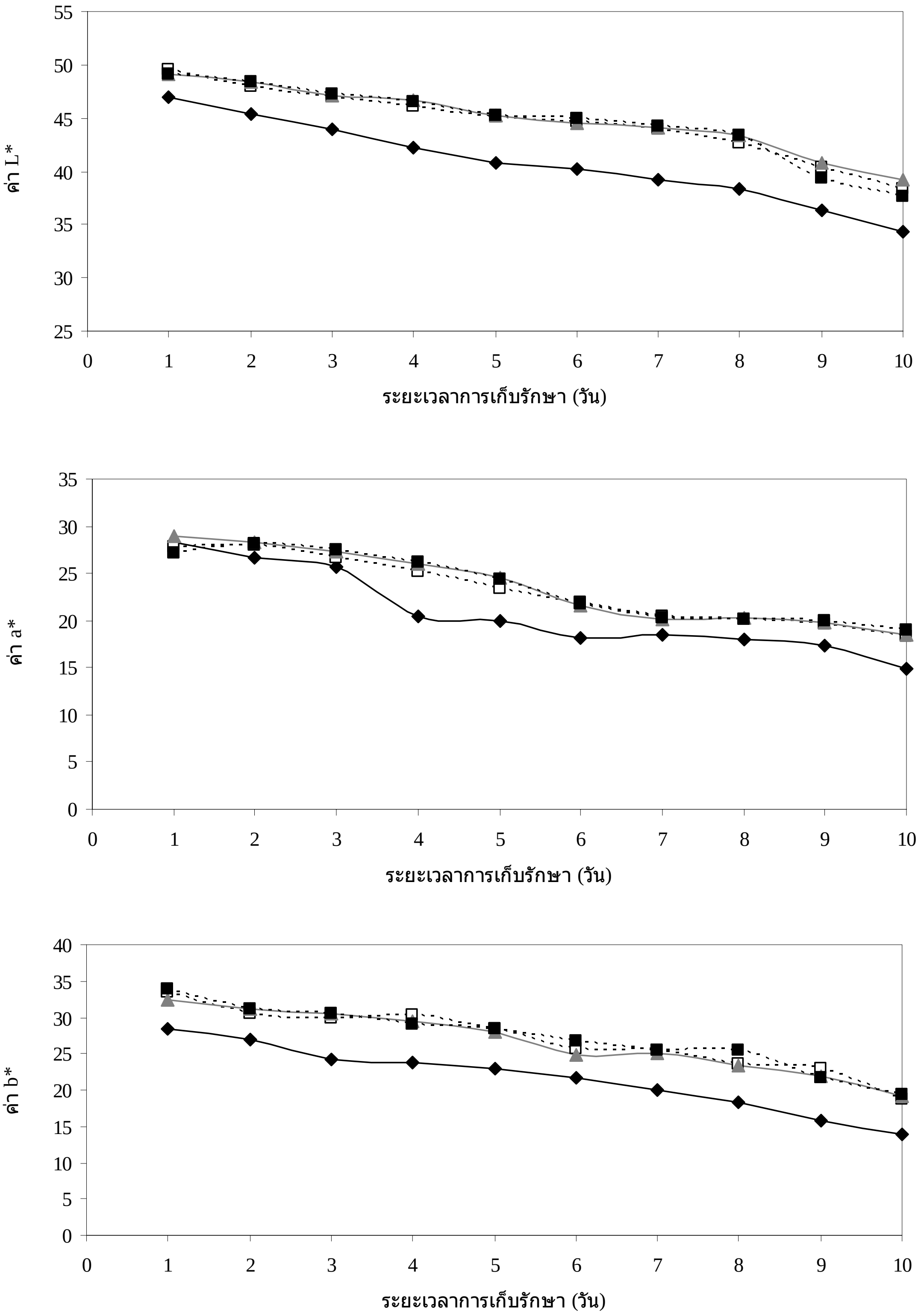
ผลการวัดค่า L* a* และ b* ของปูนิ่มนึ่ง พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ เท่ากับ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ และ การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าสีที่วัดได้ทั้ง 3 ค่า แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม โดยค่าสีที่วัดได้ทั้ง 3 ค่า ของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ รวมทั้งสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีค่าใกล้เคียงกัน แต่มีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และ จะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 70)

เมื่อพิจารณาค่าสีทั้งหมดของทั้งปูนิ่มสดและปูนิ่มสุก จะเห็นได้ว่าเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ปูนิ่มมีค่า L* a* และ b* ลดลง แสดงว่า ปูนิ่มมีสีคล้ำมากขึ้น และเมื่อนำปูนิ่มมาแช่ในสารละลาย EDTA ที่มีสมบัติในการจับโลหะทองแดง ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และสารละลายผสมระหว่าง EDTA และโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ โดยสารประกอบซัลไฟต์ไปขัดขวางปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ให้กับสารโมโนฟีนอลที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารสีน้ำตาลดำ (Chen, *et al.*, 1991a; Ferrar and Walker, 1999) ดังนั้นปฏิกิริยาสีน้ำตาลจึงเกิดขึ้นได้ช้า เนื่องจากสามารถชะลอกิจกรรมของเอนไซม์ ทำให้ปูนิ่มเกิดสีคล้ำช้าลงได้



ภาพที่ 69 การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* a* b* ของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

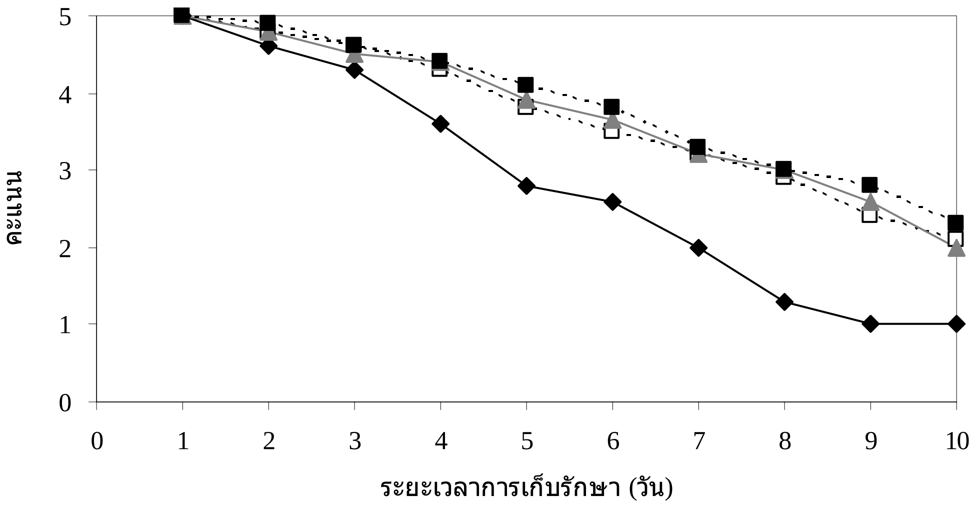


ภาพที่ 70 การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* a* b* ของปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

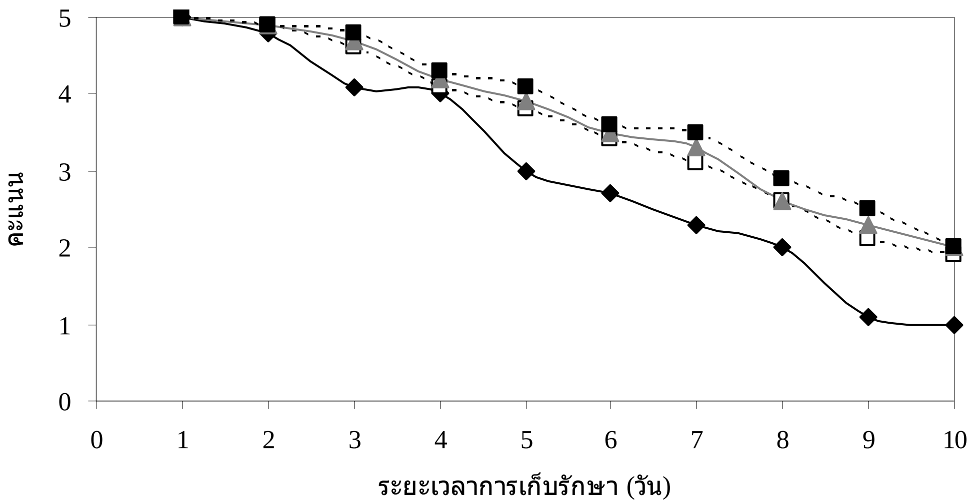
3.2.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผลการให้คะแนนตามเกณฑ์การให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพของปูนิ่มสดทั้งในส่วนที่เป็นกระดองและลำตัว (ภาพที่ 71) คะแนนของกลิ่น (ภาพที่ 72) รวมถึงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพของปูนิ่มนึ่งทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อปู (ภาพที่ 73) และคะแนนของกลิ่น (ภาพที่ 74) พบว่าการแช่ปูนิ่มในสารละลายต่างกัน คือ สารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15, 25 มิลลิโมลาร์ และ สารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ ผู้ทดสอบให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05) แต่มีคะแนนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) กับตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาและคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น



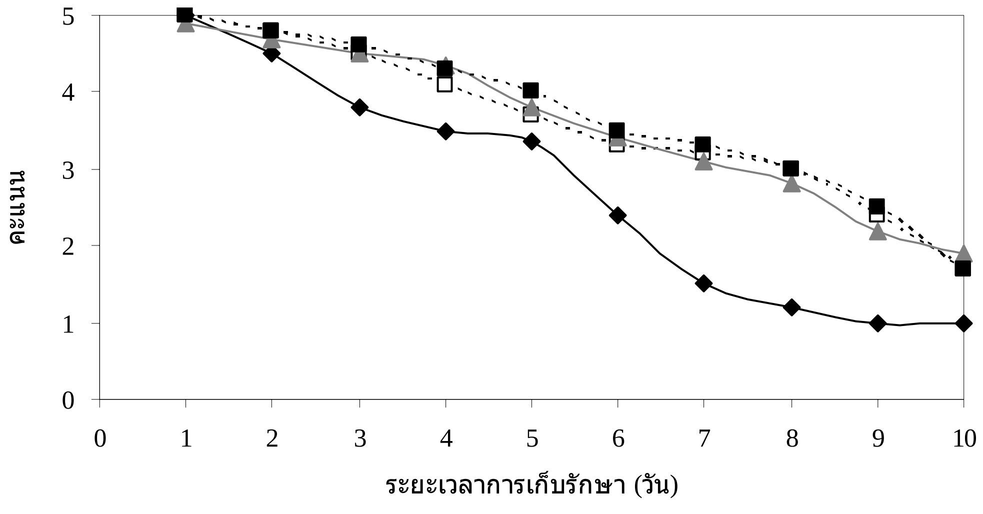
ภาพที่ 71 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกระดองและลำตัวของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



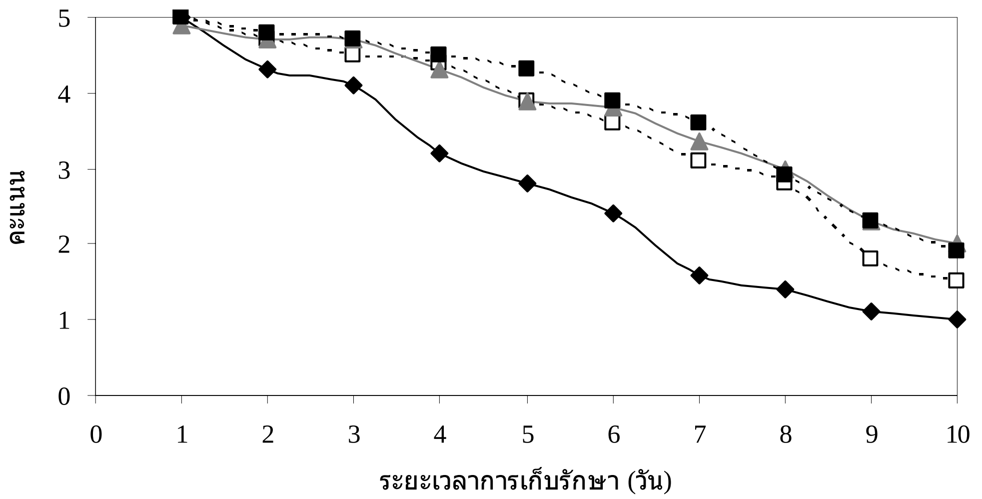
ภาพที่ 72 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพกลิ่นของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 73 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 74 การเปลี่ยนแปลงคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

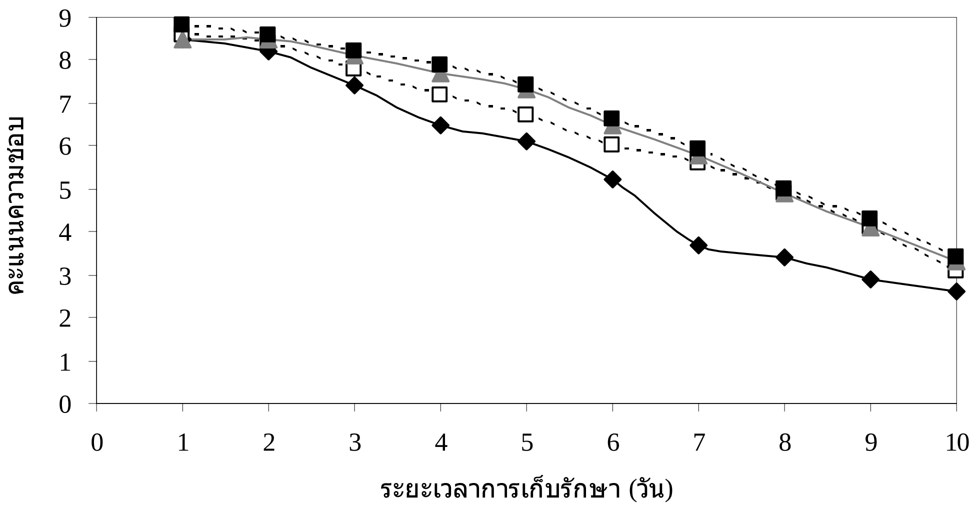
การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดในทุกคุณลักษณะของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายต่างชนิดกัน พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ กับระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบตัวอย่างปูที่แช่ในสารละลายผสม และสารละลาย EDTA สูงกว่า ตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น

การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดด้านลักษณะปรากฏ พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบของปูที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 25 มิลลิโมลาร์ ใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าปูนิ่มแช่ในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมทั้ง 3 ความเข้มข้นรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ใน

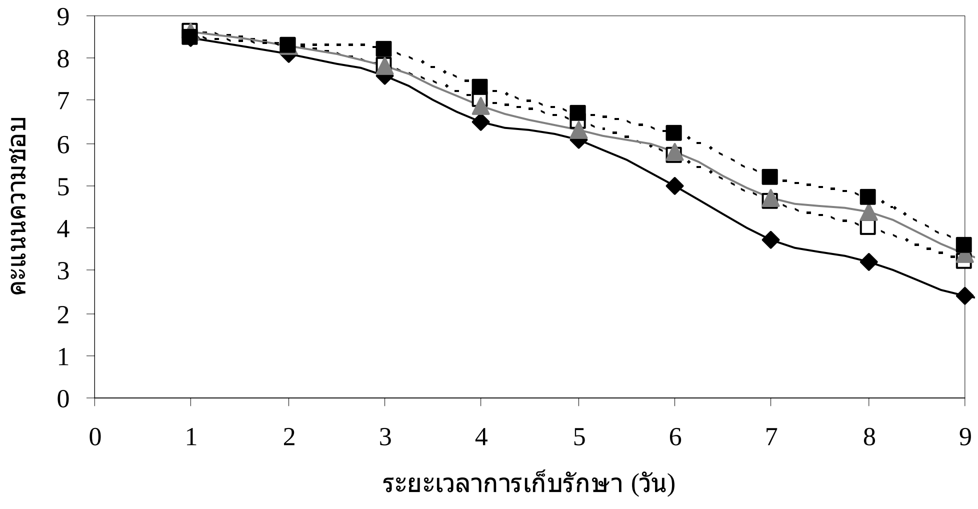
สารละลายผสมทั้ง 2 ความเข้มข้น และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 8 ส่วนตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวตั้งแต่วันที่ 6 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 75)

การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดด้านสีกระดอง พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย 40 มิลลิโมลาร์ EDTA มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15, 25 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ขณะเดียวกันยังพบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในทุกตัวอย่างคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาทุกตัวอย่างจะมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และ ปูนิ่มที่แช่ในสารละลายสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ถึงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 5-4) ในวันที่ 8 ส่วนปูนิ่มที่แช่ในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเดียวกัน ในวันที่ 7 ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวตั้งแต่วันที่ 6 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 76)

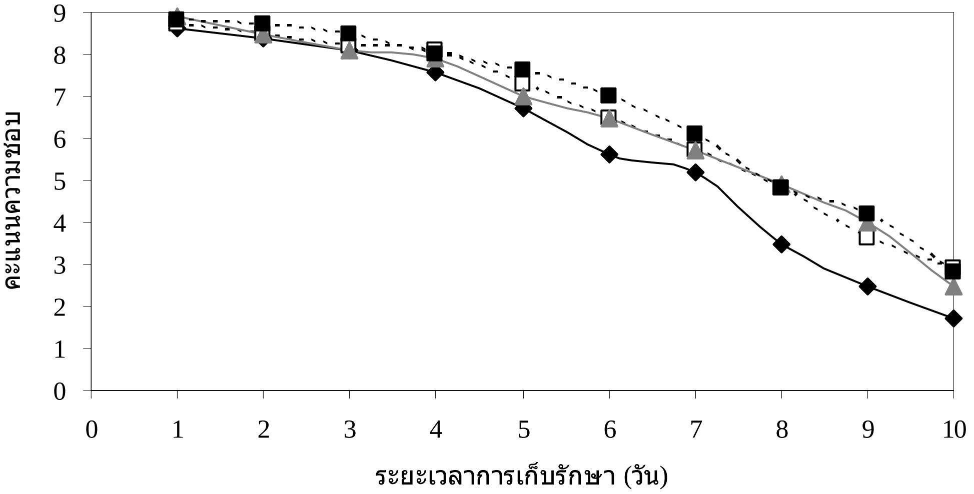
การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดด้านกลิ่น พบว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และการแช่ปูนิ่มในสารละลายผสม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นโดยในวันแรกของการเก็บรักษา พบว่า สารละลายทั้ง 3 ชนิดรวมทั้งตัวอย่างควบคุมมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิด เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 8 ส่วนตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวตั้งแต่วันที่ 7 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 77)



ภาพที่ 75 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน
น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 76 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีกระดองของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน
น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

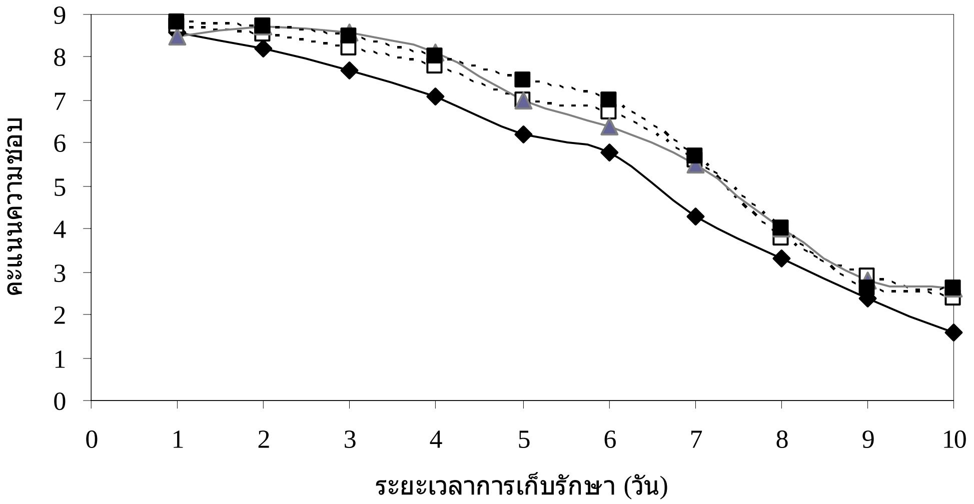


ภาพที่ 77 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

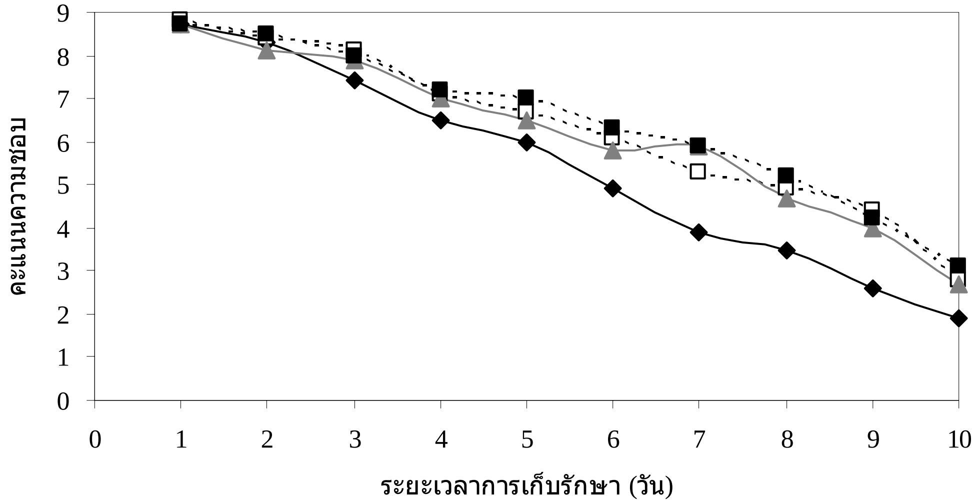
การทดสอบความชอบของปูนิ่มสดด้านเนื้อสัมผัส พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บทุกตัวอย่างมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิด เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 4) ในวันที่ 8 ส่วนตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวตั้งแต่วันที่ 7 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 78)

การทดสอบความชอบของปูนิ่มสด โดยดูจากสีเปลือกด้านท้อง (ภาพที่ 79) และความชอบรวม (ภาพที่ 80) พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบสีเปลือกด้านท้อง และความชอบรวมของปูที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบสีเปลือกด้านท้องและความชอบรวมจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษา ทุกตัวอย่างมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิด เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 8 ส่วนตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวตั้งแต่วันที่ 6 ของการเก็บรักษา



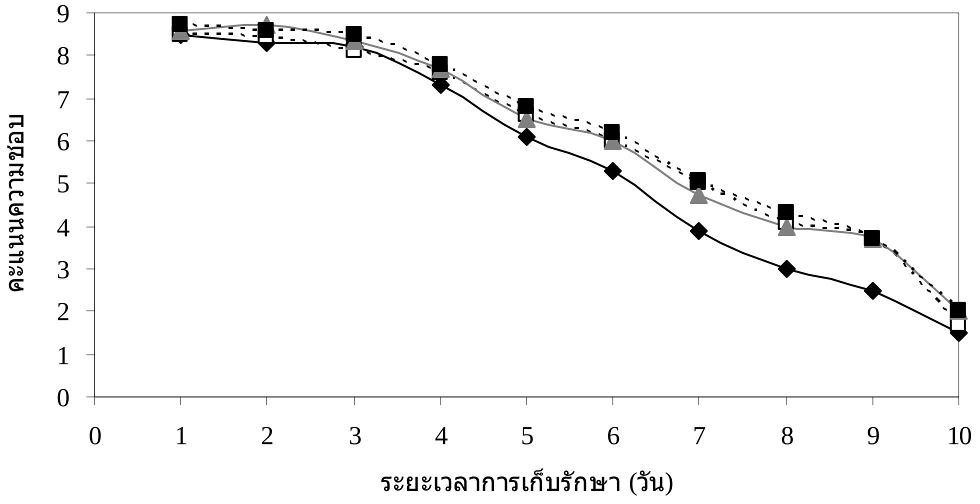
ภาพที่ 78 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 79 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีเปลือกด้านท้องของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์ EDTA

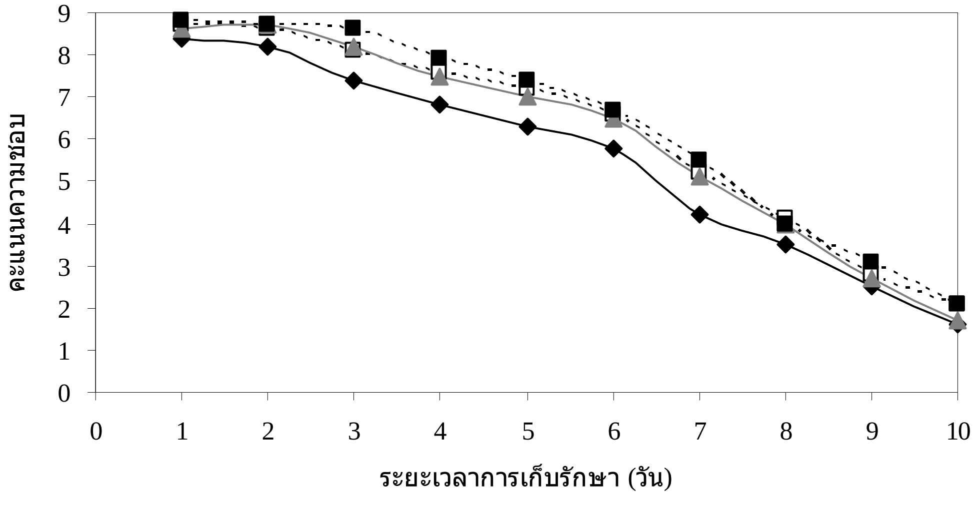


ภาพที่ 80 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

ปูนิ่มที่แช่ในสารละลายต่างกัน พบว่า คะแนนความชอบปูนิ่มนึ่งในทุกคุณลักษณะ ยกเว้นลักษณะปรากฏ มีปฏิสัมพันธ์กับระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบตัวอย่างปูที่แช่ในสารละลายผสมสูงกว่า ตัวอย่างควบคุม ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น

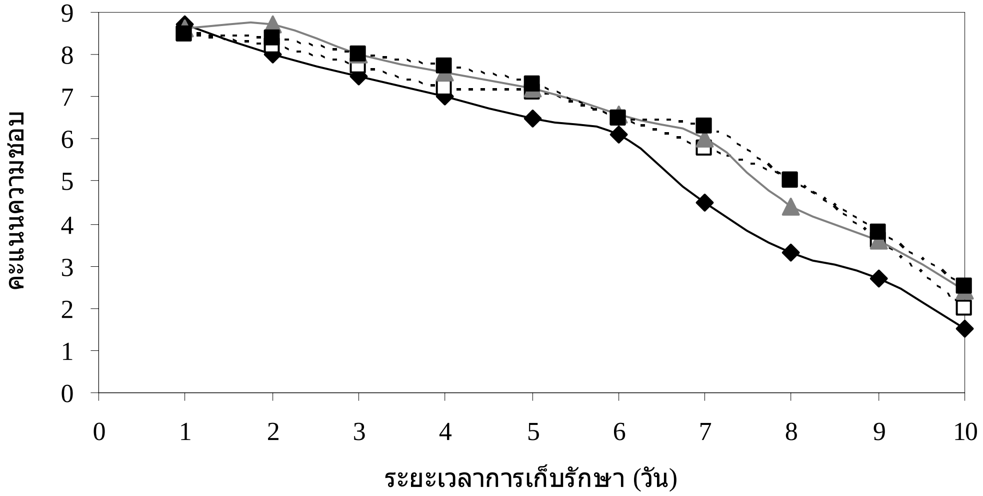
การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านลักษณะปรากฏ พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15, 25 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุม ขณะเดียวกันยังพบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในทุกตัวอย่างคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาทุกตัวอย่างจะมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และ ปูนิ่มที่แช่ในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) วันที่ 7 ขณะที่วันเดียวกันนี้ ตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 4) (ภาพที่ 81)



ภาพที่ 81 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบลักษณะปรากฏของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

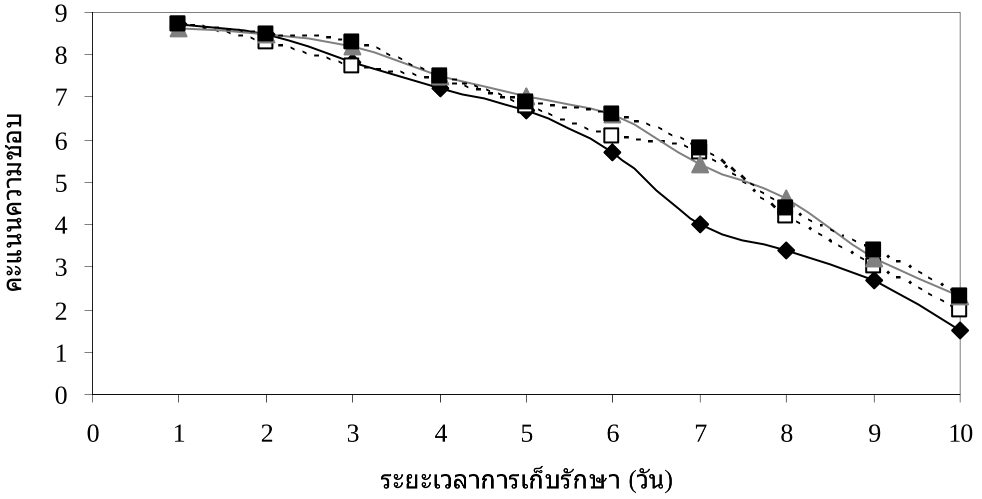
—◆— น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านสี (ภาพที่ 82) และ รสชาติ (ภาพที่ 83) พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤ 0.05) กับตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบสี และรสชาติของปูที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบสีและความ ชอบรสชาติจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษา ทุกตัวอย่างมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิด เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ถึงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 5-4) วันที่ 8 ขณะที่ตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวในวันที่ 7



ภาพที่ 82 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบสีของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น - -□- -15 มิลลิโมลาร์ —▲—25 มิลลิโมลาร์ - -■- - EDTA 40 มิลลิโมลาร์



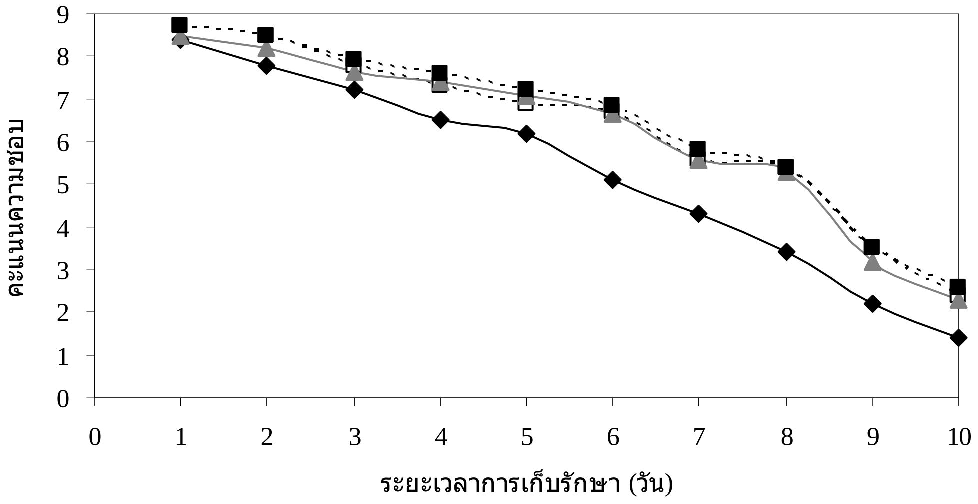
ภาพที่ 83 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรสชาติของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น - -□- - 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ - -■- - EDTA 40 มิลลิโมลาร์

การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านเนื้อสัมผัส พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของปูที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาทุกตัวอย่างมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิด เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) วันที่ 8 ขณะที่ตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวตั้งแต่วันที่ 6 (ภาพที่ 84)

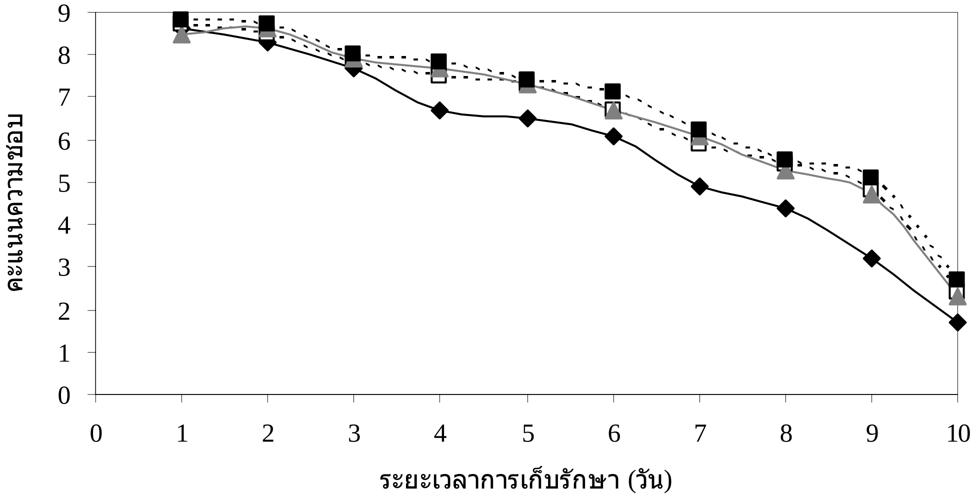
การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านกลิ่นของเนื้อ (ภาพที่ 85) พบว่า การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านกลิ่น พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบกลิ่นของปูที่แช่

ในสารละลายทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษาทุกตัวอย่างมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิด เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ (คะแนนความชอบ = 5) ในวันที่ 9 ขณะที่ตัวอย่างควบคุม เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงดังกล่าวตั้งแต่วันที่ 7 (ภาพที่ 88) แม้ว่าในวันเดียวกันนี้ คะแนนความชอบด้านกลิ่นของปูนิ่มสดจะได้คะแนนความชอบอยู่ในช่วงไม่ชอบปานกลางถึงไม่ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 3-2) ก็ตาม



ภาพที่ 84 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

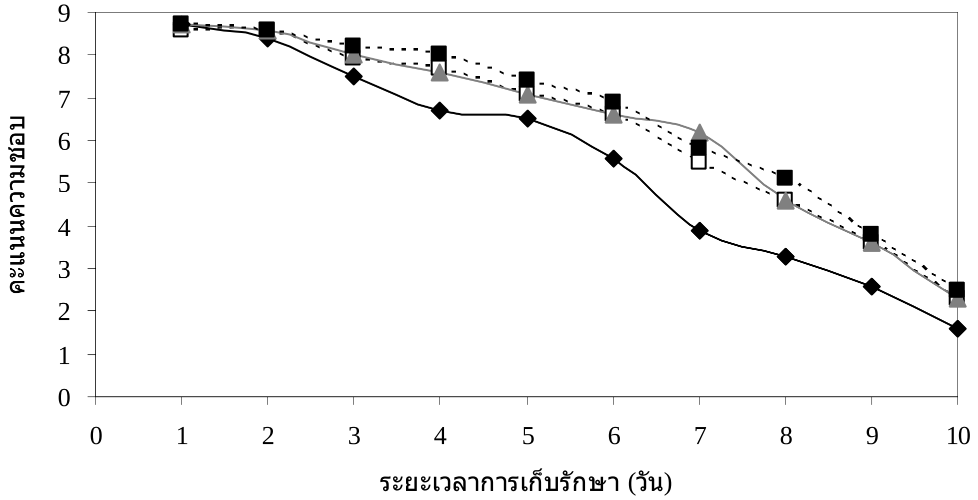
—◆— น้ำเย็น --□--15 มิลลิโมลาร์—▲—25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 85 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบกลิ่นของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น - -□- - 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ - -■- - EDTA 40 มิลลิโมลาร์

การทดสอบความชอบของปูนิ่มนึ่งด้านความชอบรวม (ภาพที่ 86) พบว่า ปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายผสมที่ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีคะแนนความชอบต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีคะแนนความชอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับตัวอย่างควบคุม โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบปูที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน และมีคะแนนความชอบสูงกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา และคะแนนความชอบจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยในวันแรกของการเก็บรักษา ทุกตัวอย่างมีคะแนนใกล้เคียงกัน คือ ชอบมาก (คะแนนความชอบ = 8) และปูนิ่มที่แช่ในสารละลายทั้ง 3 ชนิด เริ่มมีคะแนนอยู่ในช่วงเฉย ๆ ถึงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 5-4) ในวันที่ 8 ซึ่งในวันเดียวกันพบว่า ตัวอย่างควบคุมมีคะแนนความชอบรวมอยู่ในช่วงไม่ชอบเล็กน้อย (คะแนนความชอบ = 3)



ภาพที่ 86 การเปลี่ยนแปลงคะแนนความชอบรวมของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

ลักษณะปรากฏของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA และสารละลายผสมระหว่าง EDTA กับโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ นั้นจะเสื่อมคุณภาพช้ากว่าตัวอย่างควบคุม เนื่องจากสามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในตัวปูนิ่มจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งมีผลทำให้โปรตีนสูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำ แล้วมองเห็นเป็นน้ำไหลออกมาจากตัวปูนิ่ม และเนื้อปูนิ่มที่ไม่จับกันเป็นก้อนได้ โดย EDTA ไปจับกับโคเอนไซม์ของเมทาโลโปรติเอส และโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์มีผลไปลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายโปรตีเอสอีกทางหนึ่ง

ส่วนในเรื่องสีของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งนั้น การแช่ปูนิ่มในสารละลายผสมระหว่าง EDTA กับโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ นั้นสามารถลดการเกิดสีคล้ำของปูนิ่มได้ เนื่องจากมีสารยับยั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสถึง 2 ชนิดด้วยกัน โดยโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์จะไปรบกวนที่โครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เอื้อต่อการจับตัวกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (Sayavedra-Soto and Montgomery, 1986) ส่วน EDTA นั้นจับกับทองแดงบริเวณเร่งของเอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์จึงถูกชะลอ (McEvily *et al.*, 1991) เมื่อพิจารณา ค่าสี L* a* และ b* ซึ่งมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานั้น พบว่า มีความสัมพันธ์กับคะแนนความชอบด้านสีของปูนิ่มสด โดยมีค่า correlation coefficient (r^2) เท่ากับ 0.9250, 0.8999 และ 0.7864 ตามลำดับ

เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ในปูนิ่มสุก มีค่า r^2 เท่ากับ 0.7566, 0.8049 และ 0.8363 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA และสารละลายผสมระหว่าง EDTA และโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ให้ค่าสีทั้ง 3 ค่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้สารละลาย EDTA เพียงชนิดเดียวจึงสะดวกในทางปฏิบัติมากกว่าการใช้สารละลายผสม

การที่เอนไซม์โปรติเอสมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและการอ่อนตัวของกล้ามเนื้อสัตว์น้ำภายหลังการตาย ส่งผลให้สัตว์น้ำเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อสัมผัส และเสื่อมคุณภาพลง (Jiang, 2000) Haard (1994) พบว่า เอนไซม์คล้ายทริพซิน และคอลลาจีเนส ซึ่งถูกหลั่งออกมาจากเฮพาโทแพนเครียสจะทำให้เนื้อกุ้งและผลิตภัณฑ์จากกุ้งมีเนื้อนิ่มเละ ซึ่งในการทดลองนี้ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น เนื้อสัมผัสของปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่ง มีลักษณะนิ่มเละ ขาดความยืดหยุ่น ไม่เป็นเส้นใย เนื้อเป็นแป้ง เช่นกัน อย่างไรก็ตาม เนื้อสัมผัสของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA เพียงชนิดเดียวหรือสารละลายผสมระหว่าง EDTA กับโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ไม่ได้มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่มโดยตรง

กลิ่นไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งในปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งนั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจนเป็นสาเหตุสำคัญของการเน่าเสียของสัตว์น้ำ โดยเกิดจากการสลายตัวของสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีน ซึ่งให้กลิ่นรสในสัตว์น้ำและอาจเกิดเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นเหม็นเน่า สุทธวัฒน์ (2548) กล่าวว่า ในช่วงแรกของการเก็บรักษา เอนไซม์ในสัตว์น้ำจะมีบทบาทต่อการย่อยสลายตัวเองโปรตีน ต่อจากนั้นจุลินทรีย์ซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นจะทำงานร่วมกันในการย่อยสลายโปรตีน โดยไดเมธิลไตรซัลไฟด์ เป็นสารที่พบในกุ้งที่มีกลิ่นไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การแช่ปูนิ่มลงในสารละลาย EDTA แลในสารละลายผสมระหว่าง EDTA กับโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ช่วยชะลอการเกิดกลิ่นดังกล่าวได้ เนื่องจาก EDTA มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการย่อยสลายตัวเอง ส่วนโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์นั้น มีผลไปลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Muller *et al*., 2004) นั่นเอง

รสชาติของปูนิ่มนึ่งที่ได้รับความชอบจากผู้ทดสอบลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้นนั้น เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน กล่าวคือ เมื่อมีการย่อยสลายตัวเองมากขึ้น ทำให้กรดอะมิโนอิสระจำพวก อะลานีน กลัยซีน กลูตามิก และอาร์จินีน ซึ่งเป็นสารสำคัญที่สร้างรสชาติของปูทะเล (Chiou and Huang, 2004) ถูกย่อยสลายมากขึ้นด้วย รวมทั้งองค์ประกอบ

ทางเคมีอื่น ๆ เช่น เปปไทด์ และนิวคลีโอไทด์ก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างรสหวาน รสอร่อย ตลอดจนการรับรสชาติของปูเช่นกัน

เมื่อพิจารณาอายุการเก็บรักษาจากคะแนนความชอบของปูนิ่มสด ซึ่งเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคใช้พิจารณาในการเลือกซื้อปูนิ่มที่วางจำหน่ายตามท้องตลาด พบว่า อายุการเก็บรักษาของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ และปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมระหว่าง EDTA 40 มิลลิโมลาร์ กับโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ซึ่งมีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์แตกต่างกัน ได้แก่ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ นั้น จะเห็นได้ว่า ต่างก็สามารถเก็บรักษาได้นาน 8 วันเท่ากัน ขณะที่ตัวอย่างปูนิ่มทีไม่ได้แช่สารเคมี (ตัวอย่างควบคุม) สามารถเก็บรักษาได้ 6 วัน ซึ่งการเลือกใช้สารเพียงชนิดเดียวจะลดความยุ่งยากในการเตรียม ทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ จึงให้ผลดีที่สุด ทั้งในด้านอายุการเก็บรักษาและการนำไปปฏิบัติจริง แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากตัวอย่างควบคุม และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีอายุการเก็บรักษาที่ยังคงคุณภาพของปูนิ่มต่างกันเพียง 2 วัน ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาปูนิ่มจึงขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของผู้ผลิตด้วย

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษากระบวนการดูแลรักษาคุณภาพปูนิ่มหลังการเก็บเกี่ยว แบ่งออกเป็น 4 หัวข้อตามวัตถุประสงค์ดังนี้

ผลการศึกษาดัชนีความสดที่เหมาะสมในการวัดความสดของปูนิ่มได้แก่ ค่า TVB-N ซึ่งพบว่า ค่า TVB-N มีปริมาณสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยมีความสัมพันธ์กับคะแนนความชอบโดยรวมของปูนิ่มสด ($r^2 = 0.9520$) ปริมาณ TVB-N ที่อยู่ในเกณฑ์คือน้อยกว่า 13.53 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม.และคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการแบ่งชั้นคุณภาพความสดของปูนิ่มสด ได้แก่ ลักษณะของกระดองและลำตัว และกลิ่นของปูนิ่มสด ส่วนหลักเกณฑ์ในการแบ่งชั้นคุณภาพความสดของปูนิ่มนึ่งได้แก่ ลักษณะเนื้อปู และกลิ่นของเนื้อปู นอกจากนี้วิธีการเก็บรักษาปูนิ่มก่อนการแช่เยือกแข็งที่เหมาะสมมากที่สุด คือ การเก็บรักษาปูนิ่มในน้ำแข็ง โดยสามารถเก็บรักษาปูนิ่มได้ 6 วัน

ผลการศึกษาวิธีการเก็บรักษาปูนิ่มที่เหมาะสมก่อนการแปรรูป สรุปได้ว่าปูนิ่มบรรจุในถุงพลาสติกเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บรักษานาน 5 วัน เมื่อเก็บรักษาในน้ำแข็ง และในน้ำแข็งผสมน้ำสามารถเก็บรักษาได้นาน 6 วันเท่ากัน แต่เมื่อคำนึงถึงลักษณะการบรรจุปูนิ่มที่ใช้อยู่ทั่วไปเกษตรกรจะบรรจุปูนิ่มในกล่องพลาสติกใส มีฝาปิด และใช้ลวดเย็บกระดาษเย็บให้ติดกัน จึงมีช่องว่างให้น้ำเข้าไปในกล่องได้ ดังนั้นสภาวะการเก็บรักษาปูนิ่มที่เหมาะสมคือการเก็บในน้ำแข็ง

ผลการศึกษาคุณลักษณะบางประการของเอนไซม์โปรติเอสพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว เนื้อส่วนก้าม และเฮพาโทแพนเครียส เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท คือ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ส่วนค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6 นั้นเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว และเฮพาโทแพนเครียส ในขณะที่ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อส่วนลำตัวและเนื้อส่วนก้าม คือ 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ สารเคมีที่มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อลำตัวและเฮพาโทแพนเครียสมากที่สุดคือ EDTA คิดเป็นร้อยละ 41.72,

62.81 และ 72.98 ตามลำดับ ส่วน SBTI นั้นมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อส่วนก้ามได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 58.43 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรท พบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนลำตัว และเฮพาโทแพนเครียส มีความจำเพาะเจาะจงต่อเมทาโลโปรติเอสสูงสุด ส่วนเอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อส่วนก้าม มีความจำเพาะเจาะจงต่อทริพซินสูงสุด สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้จากปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนก้ามและเฮพาโทแพนเครียส คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส คืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อส่วนลำตัว และที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8 นั้นเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดได้ปูนิ่ม ทั้งตัว เนื้อส่วนก้าม เนื้อส่วนลำตัว และเฮพาโทแพนเครียส และโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ให้ผลสูงสุดในการยับยั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้ปูนิ่มทั้งตัว เนื้อส่วนก้าม เนื้อส่วนลำตัว และเฮพาโทแพนเครียส ร้อยละ 81.25, 70.23, 80.33 และ 79.34 ตามลำดับ

ผลการศึกษาการใช้สารเคมีในการยับยั้งการสูญเสียความแน่นเนื้อและการเกิดสีน้ำตาลในปูนิ่ม พบว่า วิธีการชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพดังกล่าวได้ทางหนึ่ง คือ การแช่ปูนิ่มในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ นาน 10 นาที ก่อนนำไปเก็บรักษาในน้ำแข็ง (น้ำแข็ง 3 กิโลกรัม/ปูนิ่ม 1 กิโลกรัม) จะสามารถเก็บรักษาปูนิ่มได้นาน 8 วัน ในขณะที่ปูนิ่มที่แช่ในน้ำเย็น นาน 10 นาที เก็บรักษาได้นาน 6 วันแต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากตัวอย่างปูนิ่มที่แช่ในน้ำเย็น และปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA 40 มิลลิโมลาร์ มีอายุการเก็บรักษาที่ยังคงคุณภาพของปูนิ่มต่างกันเพียง 2 วัน ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาปูนิ่มจึงขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของผู้ผลิตด้วย

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากค่าลักษณะเนื้อสัมผัสของปูนิ่มที่วัดโดยวิธี TPA (Texture Profile Analysis) ไม่มีค่าเฉลี่ยที่มีแนวโน้มที่แน่นอน รวมทั้งไม่มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการเก็บรักษา ดังนั้นควรใช้วิธีการอื่น หรือค่าอื่น เพื่อให้สามารถนำมาเป็นข้อมูลในการบอกถึงความสดของปูนิ่มได้

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของการใช้สารเคมีร่วมกับการปรับสภาวะในการเก็บรักษา รวมถึงบรรจุภัณฑ์ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาปูนิ่มสดให้นานยิ่งขึ้น

ควรศึกษาผลของอัตราการแช่แข็งและการบวนการแช่แข็งทำละลาย (freeze-thaw cycle) ต่อคุณภาพของปูนิ่ม เพื่อคุณภาพของปูนิ่มแช่แข็งที่ดีขึ้น

ควรศึกษาการทำเอนไซม์โปรติเอสและโพลีฟีนอลฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลอธิบายการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปูนิ่มให้ละเอียดยิ่งขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชลธิ ชีวะเศรษฐธรรม. 2539. **การเพาะเลี้ยงปูทะเล (*Scylla serrata* Forskal).** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. ปัตตานี.

บรรจง เทียนส่งรัศมี. 2545. ปูนิ่ม เทคโนโลยีที่น่าจับตามอง. **เทคโนโลยีชาวบ้าน** 14 (284): 102-103.

_______. 2546. สัมมนาการเพาะเลี้ยงปู. **นานาสัตว์น้ำ** 7 (3): 6-11.

_______และบุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2545. **ปูทะเล ชีววิทยา การอนุรักษ์ทรัพยากรและการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์แบบยั่งยืน**. เครือข่ายวิจัยและพัฒนา "อุตสาหกรรมพืชและสัตว์น้ำ" สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยชุดที่ 3.

ประจวบ หลำอุบล. 2537. **สรีรวิทยาของกุ้ง.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 4. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ไพรัตน์ นาควิโรจน์. 2527. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกุ้งระหว่างขบวนการแปรรูป. **วารสารอาหารและอุตสาหกรรมเกษตร** 1(1): 6-16.

มาโนช หงษ์พร้อมญาติ และบุญส่ง สิริกุล. 2512. การทดลองเลี้ยงปูทะเลในบ่อ. **รายงานประจำปี 2512** สถานีประมงจังหวัดจันทบุรี กรมประมง, กรุงเทพฯ.

เยาวลักษณ์ จิตต์ภักดี. 2543. **แบคทีเรียที่ทำให้เกิดฮีสตามีนในปลาอินทรีเค็ม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีระนอง. ม.ป.ป. เอกสารเผยแพร่การเลี้ยงปูนิ่ม. **งานประชุมวิชาการของสมาชิกองค์กรการเกษตรในอนาคตแห่งประเทศไทย (อกท.)** ภาคใต้ ครั้งที่ 22. กองวิทยาลัยเกษตรกรรม กรมอาชีวศึกษา.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548. **เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ**. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. ม.ป.ป. **โครงการปู**. สำนักงานเครือข่ายและวิจัยพัฒนา "อุตสาหกรรมพืชและสัตว์น้ำ" แหล่งที่มา: http:// www.ku.ac.th/agri/crab/images. 23 พฤศจิกายน 2547.

Ababouch, L. 1991. Histamine food poison: an update. **Fish. Tech. News.** 11(1): 3-9.

Alasalvar, C., K.D.A. Taylor and F. Shahidi. 2002. Comparative quality assessment of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. **J. Agri. Food Chem.** 50: 2039–2045.

Allain, P. 2004. Metabolism. **Histamine**. Available Source: http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output /Histamine 2. June 20, 2006.

An, H., T.A. Seymour, J.W. Wu and M.T. Morrissey. 1994. Assay systems and characterization of Pacific whiting (*Merluccius productus*) protease. **J. Food Sci.** 59: 277-281.

AOAC. 1995. **Official Methods of Analysis.** 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

Aoki, H., M.N. Ahsan, K. Matsuo, T. Hagiwara and S. Watabe. 2004. Partial purification of proteases that are generated by processing of Northern shrimp (*Pandalus borealis*) and which can tenderize beef. **Intern. J. Food Sci. Technol.** 39: 471-480.

Arnold, S.H. and W.D. Brown. 1978. Histamine toxicity from fish product**. Adv. Food Res.** 24: 114-147.

Asghar, A. and A.R. Bhatti. 1987. Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle: their significance in muscle physiology and during postmortem aging events in carcasses. **Adv. Food Res.** 31: 343-451.

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

Baranowski, E S., W.K. Nip and J.H. Moy. 1984. Partial characterization of a crude enzyme extract from the freshwater prawn (*Macrobrachium resenbergii*). **J. Food Sci**. 49: 1494-1495, 1505.

Barnett, D. 1985. Sulphites in foods: their chemistry and analysis. **Food Tech. Aust.** 37: 503–505.

Barrett, A.J. 2001. Proteolytic Enzymes: Nomenclature and Classification. pp.1-21. *In* R. Beynon and J.S. Bond, eds. **Proteolytic Enzymes** 2nd ed. Oxford University Press, New York.

_______ and H. Kirschke. 1981. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. **Methods Enzymol.** 80(41): 535-561.

Benjakul, S., W. Visessanguan and M. Tanaka. 2005. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). **J. Food Biochemistry.** 29(5): 470-485.

Birk, Y. 1976. Trypsin and chymotrypsin inhibitors from soybean. **Methods Enzymol.** 45: 707.

Botta, J.R. 1995. **Evaluation of Seafood Freshness Quality**. Marine Institute. St. John's, Newfoundland, Canada.

Bourne, M.C. 1978. Texture profile analysis. **Food Technology.** 32(7): 62–66.

Brown, J.H., J.F. Wichkins and M.H. Maclean. 1991. The influence of water hardness on growth and carapace mineralization of juvenile freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. **Aquaculture** 95: 329-345.

Cardenas, W. and J.R. Dankert. 2000. Cresolase, catecholase and laccase activities in haemocytes of the red swamp crayfish. **Fish & Shellfish Immunol.** 10: 33–46.

Castel, C.H. 1946. The effect of trimethylamine oxide on the growth of bacteria. **J. Fish. Res. Board Canada.** 6: 491-497.

Ceccaldi, H.J. 1997. Anatomy and physiology of digestive system. **Advances in World Aquaculture** 6: 261-291.

Chang, S.S. and R.J. Peterson. 1977. Recent developments in flavor of meat. **J. Food Sci.** 42: 298-305.

Chen, J.S., C.I. Wei, R.S. Rolle, W.S. Otwell, M.O. Balaban and M.R. Marshall. 1991a. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenoloxidase. **J. Agric. Food Chem.** 39:1396-1401.

_______, R.S. Rolle, M.R. Marshall and C.I. Wei. 1991b. Comparison of phenoloxidase activity from Florida spiny lobster and Western Australian lobster. **J. Food Sci.** 56: 154–160.

Chiou, T.K. and J.P. Huang. 2003. Chemical constituent in abdominal muscle of cultured mud crab *Scylla serrata* in relation to seasonal variation and maturation. **J. Fish. Sci.** 69: 579-604.

_______ and _______. 2004. Biochemical changes in the abdominal muscle of mud crab *Scylla serrata* during storage. **J. Fish. Sci.** 70: 167-173.

Christopher, A.T., E.B. Louis and G.B. Karen. 2006. The effects of hypoxia and pH on phenoloxidase activity in the Atlantic blue crab (*Callinectes sapidus*). **Comp. Biochem. Physiol. Part A: Molecular & Integrative Physiology.** 144(2): 218-223.

Chung, H.Y. and K.R. Cadwallader. 1994. Volatile components in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat and processing by-product. **J. Food. Sci.** 58(6): 1203-1211.

Conway, E.J. and A. Byrne. 1936. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. I. The micro determination of ammonia. **J. Biochem.** 27: 419- 429.

Córdova Murueta, J.H., M.D.I.A. and F. García Carreño. 2007. Concentrates of fish protein from by catch species produced by various drying processes. **Food Chemistry.** 100(2): 705-711.

CRC Reef Research Centre. 2005. **Mud crab**. Available Source: http://www.reef.crc.org.au/research/fishing_fisheries/statusfisheries/crabmud.htm, May 2, 2007.

Crawford, D.L., D.K. Law, J.K. Babbitt and L.A. Gill. 1979. Comparative stability and desirability of frozen pacific hake fillet and mince flesh block. **J. Food Sci.** 44(2): 363-367.

Dahlmann, B. and H. Reinauer. 1978. Purification and some properties of an alkaline proteinase from rat skeletal muscle. **J. Biochem.** 171: 803-810.

Da Ponte, D.J.B., J.P. Roozen and W. Pilnik. 1986. Effect of additive, irradiation and heating on the activity of trimethylamine oxidase in frozen stored minced fillet of the Pacific whiting. **J. Food Technol.** 21: 33-43.

Davidson, M.P. and K.V. Juneja. 1990. Antimicrobial Agents, pp. 102-105, 494, 634-681. *In* L.A. Branen and M.P. Davidson, eds. **Food Additives.** Marcel Dekker, New York.

Diaz-Tenorio, L.M., F.L. Garcia-Carreno and M.A. Navarrete del Toro. 2006. Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus,* and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus*. **Invertebrate Biology.** 125:125-135.

Department of Primary Industries of Queensland. n.d. **Fisheries information leaflet.** Brisbane. Available Source: http://www.dpi.qld.gov.au/extra/pdf/fishweb/mudcrab.pdf, December 2, 2004.

Egan, H., R.S Kirk and R. Sauyer. 1981. **Pearsons Chemical Analysis of Foods.** London, England.

Eisen, A.Z., K.O. Henderson, J.J. Jeffrey and R.A. Bradshaw. 1973. A collagenolytic protease from hepatopancreases of fiddler crab (*Uca pugilator*) purification and properties. **Biochemistry.** 12: 1814-1821.

Eitenmiller, R.R. 1974. Cathepsin activity of *Penaeus setiferus* muscle. **J. Food Sci.** 39: 6-9.

Emanuel, M.B. 1999. Histamine and the anti-allergic antihistamine: a history of their discoveries. **Clinical & Experimental Allergy.** 29: 1-11.

Erdogdo, F., M.O. Balaban, W.S. Otwell and L. Garrido. 2004. Cook-related yield loss for Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) previously treated with phosphates: effect of shrimp size and internal temperature distribution. **J. Food Eng.** 64: 297-300.

Erikson, U., A.R. Beyer and T. Sigholt. 1997. Muscle high-energy phosphates and stress affect K-values during ice storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **J. Food Sci.** 62: 43-47.

Fan, T.J. and X. F. Wang. 2002. Purification and partial biochemical characterization of phenoloxidase from *Penaeus chinensis*. **Acta Biochem. Biophys. Sin.** 34: 589–594.

FAO. 1981. **The prevention of losses in cured fish.** FAO Fisheries Technical Paper. 219 p.

Fatima, R., M.A. Khan and R.B. Qadri. 1988. Shelf-life of shrimp (*Penaeus merguiensis*) stored in ice and partially frozen. **J. Food Sci.** 42: 235-247.

Fernandez, A.V., F.L. Garcia-Carreno, M.A. Navarrete del Toro and J.L. Fenucci. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. **Comp. Biochem. Physiol.** 130B: 331-338.

Ferrer, O.J., W.S. Otwell and M.R. Marshall. 1989a. Effect of bisulfite on lobster shell phenoloxidase. **J. Food Sci.** 54: 478-480.

_______ , J.A. Koburger, B.K. Simpson, R.A. Gleeson and M.R. Marshall. 1989b. Phenoloxidase levels in Florida spiny lobster (*Panulirus argus*); relationship to season and molting stage. **Comp. Biochem. Physiol.** 93B: 595–599.

_______ , _______ , W.S. Otwell, R.A. Gleeson, B.K. Simpson and M.R. Marshall. 1989c. Phenoloxidase from the cuticle of Florida spiny lobster (*Panulirus argus*): Mode activation and characterization. **J. Food Sci.** 54: 63–67.

Ferrar, P.H. and R.L. Walker. 1999. Microorganisms as potential sources of novel diphenoloxidase inhibitors. **J. Food Biochem.** 23: 1-15.

Figueiredo, M.S.R.B., J.A. Kricker and A.J. Anderson. 2001. Digestive enzyme activity in alimentary tract of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **J. Crustacean Biology.** 21: 334-344.

Fraser, O. P. and S. Sumar. 1998. Compositional changes and spoilage in fish (part II) microbiological induced deterioration. **Nutri. Food Sci.** 6: 325–329.

Friedman, H.H., J.E. Whitney and S.A. Szczesniak. 1963. The texturometer: a new instrument for objective texture measurement. **J. Food Sci.** 28: 390–396.

Galgani, F. and F. Nagayama. 1988. Digestive proteolysis and digestive proteinases in deep sea crabs *Geryon affinis* and *Chionoecetes japonicus.* **Nippon Suisan Gakkaishi.** 54:593-598.

Garcia-Carreno, F.L. 1992. The digestive protease of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization and the effect of feed on their composition. **Comp. Biochem. Physiol.** 103B: 575-578.

_______ and N.F. Haard. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Plueroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. **J. Food Biochem.** 17: 97–113.

_______ and _______ . 1994. Preparation of an exopeptidase enriched fraction from hepatopancreas of decapod. **Process Biochem.** 29: 663–670.

_______ , M.P. Hernandez-Cartes and N.F. Haard. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from digestive system of freshwater and marine decapods. **J. Agric. Food Chem.** 42: 1442-1456.

Gates, B.J. and J.Travis. 1973. Purification and characterization of carboxypeptidase A and B from the white shrimp (*Penaeus setiferus*). **Biochem.** 12: 1867–1874.

Gill, T.A. and A.T. Paulson. 1982. Localization, characterization and partial purification of TMAO-ase. **Comp. Biochem. Physiol.** 71B: 49-56.

_______ . 1992. Biochemical and chemical indices of seafood quality, pp. 377-388. *In* H.H. Huss, M. Jacobsen and J. Liston, eds. **Quality assurance in the fish industry. Proceeding of an international conference**. Elsevier, Amsterdam.

Gollas-Galván, T., J. Hernández-López and F. Vargas-Albores. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. **Comp. Biochem. Physiol.** 122B: 77–82.

Green, J. 1961. **A Biology of Crustacea.** H.F.&G.Witherby Ltd., London.

Haard, N.F. 1994**.** Protein Hydrolysis in Seafoods, pp. 11 – 33. *In* F. Shahidi and J. R. Botta, eds. **Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality.** Blackie Academic & Professional, London.

Hameed, K.S. and N.F. Haard. 1985. Isolation and characterization of cathepsin C from Atlantic short finned squid *Illex illecebrosus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 828: 241 – 246.

Hanada, K., M. Tamai, M. Yamigishi, S. Ohmura, J. Sawada and I. Tanaka. 1978. Isolation and characterization of E-64 a new thiol protease inhibitor. **Agric. Biol. Chem.** 42: 523-528.

Handy Company. n.d. **Handy domestic soft crabs: fresh.** n. p. Available Source: http://www.handycrab.com/softshell.htm. December 2, 2004.

Hardy, R. and J.G.M. Smith. 1976. The storage of mackerel (*Scomber scombrus*). Development of histamine and rancidity. **J. Sci. Food Agric.** 27: 595-599.

Hayashi, T., K. Yamaguchi and S. Konosu. 1981. Sensory analysis of taste-active components in the extract of boiled snow crab meat. **J. Food Sci.** 46: 479-483.

Heimann, W. 1980. **Fundamentals of Food Chemistry.** Ellis Horwood, England: 137, 254-301.

Hernandez-Cortes, P., J.R. Whitaker and F.L. Garcia-Carreno. 1997. Purification and characterzation of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). **J. Food Biochem.** 21: 497–514.

Hsu, A.F., J.J. Shieh, D.D. Bills and K. White. 1988. Inhibition of mushroom polyphenoloxidase by ascorbic acid derivatives. **J. Food Sci.** 53**:** 765–767.

Huss., H.H. 1996. **Quality and quality changes in fresh fish**. FAO Fisheries Technical Paper. 348: 202–219.

Ishida, M., N. Sugiyama, M. Sato and F. Nagayama. 1995. Two kinds of neutral serine proteinases in salted muscle of anchovy, *Engraulis japonica*. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59: 1107-1112.

Iwata, K., K. Kobashi and J. Hase. 1974. Studies on muscle alkaline protease – IV: Comparison of physiochemical and enzyme properties of alkaline protease from white croaker and barracuda muscle with those of enzyme from carp. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 40: 1043–1050.

Janeway C.A., P. Travers, M. Walport and J.D. Capra. 1999. **Immunobiology: the Immune System in Health and Disease.** 4th ed. Current Biology Publication, London.

Jayasankar, V. and T. Subramoniam. 1997. Proteolytic activity in the seminal plasma of the mud crab, *Scylla serrata* (Forskal). **Comp. Biochem. Physiol.** 116B: 347-352.

Jiang, S.T. 2000. Enzyme and Their Effects on Seafood Texture. pp. 411-450. *In* N.F. Haard and B.K. Simpson, eds. **Seafood Enzyme Utilization and Influence on Post-harvest Seafood Quality.** Marcel Dekker, New York.

_______ , M.W. Moody and H.C. Chen. 1991. Purification and characterization of protease from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). **J. Food Sci.** 56: 322 – 326.

Jiansan J. and C. Jiaxin. 2001. **Sea Farming and Sea Ranching in China.** FAO Fisheries Technical paper 418. Available Source: http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/005/Y2257E/y2257e05.htm. December 2, 2004.

Karthikeyan, M., T.J. Abraham, G.I. Jasmine and P. Jeyachandran. 1999. Effect of post-harvest handling on the shelf life of cultured shrimp (*Penaeus indicus*) in ice. **J. Food Sci.** 36: 177–179.

Kim, J., M.R. Marshall and C.I. Wei. 2000. Polyphenoloxidase. pp. 271–315. *In* N.F. Haard and B.K. Simpson, eds. **Seafood Enzyme Utilization and Influence on Post-harvest Seafood Quality.** Marcel Dekker, New York.

Kristjansson, M.M., S. Guthmundsdottir., J.W. Fox and J.B. Bjarnason. 1995. Characterzation of collagenolytic serine proteinase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comp. Biochem. Physiol.** 110 B: 707-717.

Kuballa, A. and A. Elizur. 2007. Novel molecular approach to study moulting in crustaceans. **Bull. Fish. Res. Agen.** 20:53-57.

Kubota, M., M. Kinoshita, S. Kubota, M. Yamashita, H. Toyohara and M. Sakaguchi. 2001. Possible implication of metallo proteinases in post-mortem tenderization of fish muscle. **Fisheries Science.** 67 (5): 965–968.

Kyrana, V.R. and V.P. Lougovois. 2002. Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. **Intern. J. Food Sci. Technol.** 37: 319–328.

Lakshmanan, R., R.J. Shakila and G. Jeyasekaran. 2002. Survival of amine- forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. **Food Microbiol.** 19: 617-625.

Lerner, A.B. 1953. Metabolism of phenylalanine and tyrosine. **Adv. Enzymol.** 14: 73-128.

Liu, G., L. Yang, F. Tingjun, R. Cong, Z. Tang, W. Sun, X. Meng and L. Zhu. 2006. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica.* **Fish & Shellfish Immunology.** 20: 47-57.

Makinodon, Y., T. Akasaka, H. Toyohara and S. Ikeda. 1982. Purification and some properties of carp muscle cathepsin D. **J. Food Sci.** 47: 647.

Markakis, P and R.J. Embs. 1966. Effect of sulfite and ascorbic on mushroom phenol oxidase. **J. Food Sci.** 31: 807-811.

Marshall, M. R., J. Kim and C. Wei. 2000. Polyphenoloxidase. pp. 271-307. *In* N.F. Haard and B.K. Simpson, eds. **Seafood Enzyme Utilization and Influence on Post-harvest Seafood Quality.** Marcel Dekker, New York.

Martinez-Alvarez, O., M.E. Lopez-Caballero, P. Montero and M.C. Gomez-Guillen. 2007. Spraying of 4-hexylresorcinol based formulations to prevent enzymatic browning in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*) during chilled storage. **Food Chem.** 100: 147-155.

Martinez, M.V. and J.R. Whitaker. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends Food Sci & Tech.** 61: 195-200.

McEvily, A.J., R. Iyengar and S. Otwell. 1991. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. **Food Technol.** 45(9): 80-86.

Mizuta, S., R. Yoshinaka., M. Sato and M. Sakaguchi. 1994. Characterization of collagen in muscle of several crustacean species in association with raw meat texture. **Fish. Sci.** 60: 323-328.

_______ , Y. Kobayashi and R. Yoshinaka. 2001. Chemical and histological characterization of raw muscle from soft and hard snow crabs *Chinoecetes opilio*. **J. Food. Sci.** 66: 238-241.

Montero, P., A. Avalos and M. Perez-Mateos. 2001. Characterization of polyphenol oxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. **Food Chem.** 75: 317-324.

Morita, K., K. Kubota and T. Aishima. 2001. Sensory characteristic and volatile components in aromas of boiled prawns prepared according to experimental designs. **Food Res. Intern.** 34: 437-481.

Muller, F.H., T.M. Bandeiras, T. Urich, M.Teixeira, C.M. Gomes and A. Kletzin. 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: Characterization of a novel membrane-bound thiosulphate: quinone oxidoreductase. **Molecular Microbiology.** 53(4):1147-1160.

Nakagawa, T and F.Nagayama. 1981. Distribution of catecol oxidase in crustacean. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 47(12): 1645.

North, M.J. 1989. Prevention of Unwanted Proteolysis. pp. 105-124. *In* R.J. Beynon and J.S. Bond, eds. **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach.** IRL Press, England.

Offer, G. and P. Knight. 1988. The structural basis of water-holding in meat. pp. 63-243. *In* R. Lawrie, ed. **Development in Meat Scieence 4.** Elsevier Applied Science, London.

Ogawa, M., N.B. Perdiago, M.E. Santiago and T.T. Kozima. 1984a. On physiological aspects of black spot appearance in shrimp. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 50(10): 1763-1769.

_______, E.O. Magalhaes-neto, O. Aguilar-junior and T.T. Kozima. 1984b. Incidence of melanosis in the integumentary tissue. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 50(10): 471–475.

Ohkubo, M., K. Osatomi, K. Hara, Y. Nozaki, F. Aranishi and T. Ishihara. 2004. Purification and characterization of myofibril-bound serine protease from crucian carp *Carassius giberio* langsdorfi muscle. **Fish. Sci. 70**: 1183–1185.

Okada, S. and T. Aikawa. 1986. Cathepsin D-like acid proteinase in the mantle of the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Comp. Biochem. Physiol.** 84 B: 333–341.

_______, S.A. Nur-E-Borhan and K. Yamaguchi. 1994. Carotenoid composition in the commercial black tiger prawns. **Fish. Sci.** 60: 213-215.

Otwell, W.S., R. Iyengar and A.J. McEvily. 1992. Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexsylresorcinol. **J. Aqua. Food Prod. Technol**. 1:53-65.

Ozogul, F., A. Polat and Y. Ozogul. 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines *(Sardina pilchardus)*. **Food Chemistry.** 85: 49–57.

Ozogul, Y., G. Ozyurt, F. Ozogul, E. Kuley and A. Polat. 2005. Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. **Food Chemistry.** 92: 745–751.

Palmer, T. 1991. **Understanding Enzymes.** Ellis Horwood Limited, London.

Pacheo-Aguilar, R., M.E. Lugo-Sanchez and M.R. Robles-Burgueno. 2000. Postmortem biochemical characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0 ^{O}C. **J. Food. Sci.** 65: 40-47.

Pavasovic, M., N.A. Richardson, A.J. Anderson, D. Mann and P.B. Mather. 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab. **Aquaculture** 242 (1-4): 645-645.

Pratoomchat B, P. Sawangwong, R. Guedes, M.D.L. Reis and J. Machado. 2002. Cuticle ultrastructure changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle **. J. Exp. Zool.** 293(4): 414-426.

Price, N.C. and L. Stevens. 1982. Fundamentals of Enzymology. Oxford University Press, New York.

Rahman, M., L.,Yasmin, M.D.,Kamal, M.A. Mazid and N.M.D. Islam. 2001. Effect of delayed iceing on the quality changes in brackish water shrimp *Penaeus monodon* during ice storage. **J. Biol. Sci.** 11: 1390-1394.

Reece, P. 1988. Recovery of proteases from fish waste. **Process Biochem.** 23: 62 –66.

Rehbein, H. 1988. Relevance of trimethylamine oxide demethylase activity and haemoglobin muscle. **J. Sci. Food Agri**. 43: 261.

Rodger, G. and R. Hastings. 1984. Role of trimethylamine oxide in the freeze denaturation of fish muscle, is it simply a precursor of formaldehyde? **J. Food Sci**. 49(6): 640-641.

Rodtong, S., S. Nawong and J. Yongsawatdikul. 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Food Micro.** 22: 475-482.

Roy, P., B. Colas and P. Durand. 1996. Purification, kinetical and molecular characterizations of serine collagenolytic protease from greenshore crab (*Carcinus maenas*) digestive gland. **Comp. Biochem. Physiol.** 115B(1): 87-95.

Saborowski, R., G. Sahling, M.A. Navarette del Toro, I. Walter and F.L. Garcia-Carreno. 2004. Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus.* **J. Molecular Catalysis: Enzymatic** 30: 109-118.

Sakharov, I. and G.A. Prieto. 2000. Purification and some properties of two carboxypeptidases from the hepatopancreas of the crab *Paralithodes camtschatica*. **Mar. Biotechnol.** 2: 259-266.

Saito, J. K. Arai and M. Matsuyoshi. 1959. A new method for estimating the freshness of fish. **Bull. Jap. Soc. Si. Fish**. 24: 749-752.

Sayavedra-Soto, L.A. and M.W. Montgomery. 1986. Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. **J. Food Sci**. 51(6): 1531–1536.

Schechter, I. and A. Beger. 1967. On the size of the active site in proteinases. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 27: 157-162.

Shahidi, F. and J.R. Botta. 1994. **Seafoods : Chemical, Processing Technology and Quality.** Blackie Academic and Professional, London.

_______ . 1998. **Flavor of Meat, Meat Product and Seafood.** Thomson Science, Great Britain.

Sikorski, Z., A. Kolakowska and J. Burt. 1990. Post harvest Biochemical and Microbiological Change. pp. 55-75. *In* A.E. Sikorski, ed. **Seafood: Resource, Nutritional Composion and Preservation**. CRC Press, Florida.

Sikorski, Z.E. 1990. **Seafood: Resources Nutritional Composition and Preservation**. CRC Press Inc, Florida.

Simpson, B.K., M.R. Marshall and W.S. Otwell. 1987. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus)*: Purification and some properties. **J. Agric. Food Chem.** 35:918-921.

Sivakumar, P., L. Suguna and G. Chandrakasan. 2000. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissues of marine crab, *Scylla serrata*. **Comp. Biochem. Physiol.** 125B: 555-562.

Spinelli, J. and B.J. Koury. 1979. Nonenzymatic formation of dimethylamine in dried fishery products. **J. Agric. Food. Chem.** 29: 327-331.

Sullivan, B. 2005. **Buying soft shell crab**. Available Source: http:// www.blue-crab.org/ buying_softs.htm, January 2, 2005.

Taylor, S.L. and R.K. Bush. 1986. Sulfites as food ingredients. **Food Technol**. 40:47.

Teschke, M. and R. Saborowski. 2005. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). **J. Experimental Marine Biology and Ecology.** 316(2): 213-229.

Travis, D.F. 1954. The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus Latreille*. I. Molting and growth in laboratory maintained individuals. **Biol. Bull**. 107: 433-450.

Tsuchiya, Y., T. Takahashi, Y. Sakurai. A. Iwamatsu and K. Takahashi. 1994. Purification and characterization of novel membrane-bound arginine specific serine protease from porcine intestinal mucosa. **J. Biol. Chem**. 269: 32985-32991.

Uchiyama, H. 1978. **Analytical Method for Estimating Freshness of Fish.** Southeast Asian Fisheries Development Center, Thailand.

Umezawa, H. 1976. Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. **Methods Enzymol.** 45: 678-695.

Vazquez-Ortiz, F. A., R. Racheco-Aguilar, M.E. Lugo-Sanchez and R.E. Villegas-Ozuna. 1997. Application of the freshness quality index (K-value) for fresh fish to canned sardines from North-Western Mexico. **J. Food Compos. Anal.** 10: 158-165.

Verrez-Bagnis, V., C. Ladrat, J. Noelle and J. Fleurence. 2002. In vitro proteolysis of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) myofibrillar and sarcoplasmic proteins by an endogenous m-calpain. **J. Sci Food Agric.** 82: 1256–1262.

Vojdani, F. 1996. Solubility, pp. 11–60. *In* G.M. Hall, ed. **Methods of Testing Protein Functionality.** Chapman & Hall, New York.

Vonk, H.J. 1960. Digestion and metabolism, pp. 391 – 316. *In* T.H. Waterman ed. **The Physiology of Crustacea: Metabolism and Growth.** Academic Press, New York.

Waterman, T.H. 1977. **The Physiology of Crustacea. Vol I**. Academic Press, New York and London.

Whitaker J.D, C.M. Bearden, C.M. Cupka, C.H. Farmer and J.S. Hopskins. 1987. **Information on Establishing a Soft Shell Crab Operation in South Carolina.** South Carolina Division of Marine Resource.

Whitaker, J.R. 1994. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2nd ed. Marcel Dekker, New York. 625 pp.

_______. 1995. Polyphenol oxidase, pp. 271-307. *In* D.W.S. Wong, ed. **Food Enzymes: Structure and Mechanism.** Chapman & Hall, New York

Winkler, M.E. and K. Lerch. 1981. Competitive inhibitor binding to the binuclear copper active site in tyrosinase. **J. Am. Chem. Soc.** 103: 7001–7003.

Yamada, K and K. Amano. 1965. Studied on the biological formation of formaldehyde and dimethylamine in fish and shellfish. V. effect of methylene blue on the enzymic formation in pyloric caeca of Alaska pollock. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 31: 60.

_______, K. Harada and K. Amano. 1969. Biological formation of formaldehyde and dimethylamine in fish and shellfish. VIII. requirements of cofactor in the enzyme system. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 35: 227-231.

Yamagata, M. and L.K. Low. 1995. Rapid determination of formaldehyde in banana shrimp, *Penaeus merguiensis*. **J. Food Sci.** 60(4): 718-720.

Yoshinaka, R., K. Sato, Y. Itoh, S. Nakajima and M. Sato. 1989. Content and partial characterization of collagen in crustacean muscle. **Comp. Biochem. Physiol.** 94B(1): 219-223.

Zawistowski, J., C.G. Biliaderis and M.A.N. Eskin. 1991. Polyphenoloxidase. pp. 217-252. *In* D.S. Robinson and M.A.N. Eskin, eds. **Oxidative Enzymes in Foods.** Elsevier Science Publishers, London.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ภาคผนวกที่ ก1 แบบทดสอบความชอบปูนิ่ม โดยวิธี Hedonic scale

ชื่อผู้ทดสอบ...วันที่...........................เวลา.......................

คำแนะนำ กรุณาชิมตัวอย่างจากซ้ายไปขวาแล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด

9 = ชอบมากที่สุด	6 = ชอบน้อยที่สุด	3 = ไม่ชอบปานกลาง
8 = ชอบมาก	5 = เฉยๆ	2 = ไม่ชอบมาก
7 = ชอบปานกลาง	4 = ไม่ชอบเล็กน้อย	1 = ไม่ชอบมากที่สุด

ปัจจัย	คะแนนความชอบของตัวอย่าง			
	______	______	______	______
ปูนิ่มสด - ลักษณะปรากฏ	....	....	....	....
- สีกระดอง	....	....	....	....
- สีเปลือกด้านท้อง	....	....	....	....
- กลิ่น	....	....	....	....
- เนื้อสัมผัส	....	....	....	....
- ความชอบรวม	....	....	....	....
ปูนิ่มนึ่ง - ลักษณะปรากฏ	....	....	....	....
- สีเนื้อปู	....	....	....	....
- กลิ่น	....	....	....	....
- เนื้อสัมผัส	....	....	....	....
- รสชาติ	....	....	....	....
- ความชอบรวม	....	....	....	....

ข้อเสนอแนะ...

....

ภาคผนวกที่ ก2 แบบทดสอบการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่ม

ชื่อผู้ทดสอบ...วันที่..........................เวลา......................

คำแนะนำ กรุณาชิมตัวอย่างจากซ้ายไปขวาแล้วให้คะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพของตัวอย่างแต่ละคุณลักษณะที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด

ปัจจัย	**คะแนน**			
	_____	_____	_____	_____
กระดองและลำตัวปูนิ่มสด	....	....	....	....
กลิ่นปูนิ่มสด	....	....	....	....
เนื้อปูนิ่มนึ่ง	....	....	....	....
กลิ่นปูนิ่มนึ่ง	....	....	....	....

ข้อเสนอแนะ...

....

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และเคมี

ภาคผนวกที่ ข1 การวัดสี

1. การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างโดยใช้ปูส่วนเปลือกขนาด 3 ตารางเซนติเมตร (ขนาดของตลับที่ใช้วัดสี)

2. วิธีการทดลอง

2.1 นำตัวอย่างวัดสีในระบบ CIE โดยวัดค่า L* a* b* โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงแบบ Day light

2.2 Calibrate เครื่องวัดสีด้วย Zero Calibration CM – A12 และ White Calibration Plate CM-A120 เลือกแผ่น Target Mark ชนิด Large (LAV)

2.3 วางตัวอย่างที่เตรียมใส่ใน cell สำหรับวัดสี วัดค่า 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้หาค่าเฉลี่ย

ภาคผนวกที่ ข2 การวัดแรงกดของปูนิ่มด้วยเครื่อง Texture Analyser TA-HT

1. การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ชิ้นปูส่วนล่างซึ่งประกอบด้วยขา 3 ขา เอาเฉพาะตรงส่วนเนื้อมาวัดค่าแรงกด

2. วิธีการทดลอง

วัดค่าเนื้อสัมผัสของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่อุณหภูมิห้องโดยเลือกใช้โปรแกรม Macro The Texture Expert Exceed version ใช้หัววัด flat plunger (SMS-P/50) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 50 มิลลิเมตร กำหนดค่าความเร็วหัววัดก่อนสัมผัสตัวอย่าง (pre test speed) เท่ากับ 1.0 มิลลิเมตร/วินาที ความเร็วหัววัดขณะสัมผัสตัวอย่าง (test speed) เท่ากับ 2.0 มิลลิเมตร/วินาที ความเร็วหัววัดหลังสัมผัสตัวอย่าง (post test speed) เท่ากับ 2.0 มิลลิเมตร/วินาที ระยะการทดสอบที่ใช้คือ 60% strain

ภาคผนวกที่ ข3 การวัดค่าความเป็นกรดเบส (A.O.A.C., 1995)

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการบดละเอียด จำนวน 5 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มไล่แก๊สคาร์บอนได ออกไซด์ จำนวน 45 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียด วัดค่าความเป็นกรดเบส ด้วยเครื่องวัดที่ผ่านการปรับมาตรฐานด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเป็นกรดเบส 4 และ 7 แล้ว ตามวิธีการใช้เครื่องมือ

ภาคผนวกที่ ข4 การวัดค่าความสด (K – Value) (Uchiyama, 1978)

1. สารเคมี

1.1 สำหรับการเตรียมตัวอย่าง (เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส)

1.1.1 สารละลายกรดเปอร์คลอริค (Perchloric acid : PCA) ร้อยละ 10 :ละลาย กรดเปอร์คลอริค (ร้อยละ 60 – 70, $HClO_4$) 10 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร

1.1.2 สารละลายกรดเปอร์คลอริค ร้อยละ 5: ละลายกรดเปอร์คลอริค10 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 190 มิลลิลิตร

1.1.3 สารละลายเป็นกลางของกรดเปอร์คลอริค (Neutralized PCA): นำสารละลายกรดเปอร์คลอริค ร้อยละ 5 จำนวน 100 มิลลิลิตร มาทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มัล ให้มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.4 ทำให้สารละลายเย็นที่ 5 องศาเซลเซียส แล้วกรองตะกอน ($KClO_4$) ที่เกิดขึ้นด้วยกระดาษกรอง

1.1.4 สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มัล: ละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 56 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.1.5 สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล: ละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 5.6 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.2 สำหรับการเตรียมโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุไฟฟ้า

1.2.1 สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์: เจือจางแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 25 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 96 มิลลิลิตร

1.2.2 สารละลาย A (สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.001 นอร์มัล) : เจือจางสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มัล ปริมาตร1 มิลลิลิตร ให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2.3 สารละลาย B (สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.01 นอร์มัล ที่มีโซเดียมคอลไรด์ 0.6 โมลาร์) : ละลายโซเดียมคลอไรด์ 35.07 กรัม ด้วยน้ำกลั่นแล้วเติมสารนี้ลงในสารละลาย กรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มัล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2.4 Anion exchange resin: AG(R)– x4, 100–200 mesh chloride form (Bio-rad Co.)

1.3 สำหรับการเตรียมเรซินสำหรับแลกเปลี่ยนประจุ

1.3.1 อะซีโตน

1.3.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล

1.3.3 สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.1 นอร์มัล

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 การเตรียมเรซินสำหรับแลกเปลี่ยนประจุ

2.1.1 นำเรซิน (anion exchange resin) มาประมาณ 100 กรัม เติมอะซีโตน 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที พร้อมกับคนเป็นครั้งคราว กรองผ่านกรวยกรอง

2.1.2 เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน 1 ลิตร พร้อมกับคน นำไปกรองผ่าน กรวยกรอง

2.1.3 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล ประมาณ 500 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที พร้อมกับคนเป็นครั้งคราว กรองผ่านกรวยกรอง

2.1.4 ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 2

2.1.5 เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.1 นอร์มัล ประมาณ 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที พร้อมกับคนเป็นครั้งคราว กรองผ่านกรวยกรอง

2.1.6 ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 2 แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่าเรซินที่กรองได้ เป็นกลาง ทดสอบด้วยกระดาษวัดค่าความเป็นกรดเบส แล้วเก็บเรซินที่ผ่านการเตรียมแล้วนี้ ไว้ใช้ในขวดที่มีน้ำกลั่นปราศจากอิออน เก็บที่ 5 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมตัวอย่าง

2.2.1 นำตัวอย่างปูนิ่มที่ปั่นละเอียดมา 1 กรัม เติมสารละลายกรดเปอร์คลอริค ร้อยละ 10 (แช่เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันด้วยโกร่งบด หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 2000/3000 rpm นาน 2-3 นาที

2.2.2 แยกส่วนใสเก็บไว้ นำกากที่เหลือมาเติม เติมสารละลายกรดเปอร์คลอริค ร้อยละ 5 (แช่เย็น) จำนวน 2 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันด้วยโกร่งบด หลังจากนั้น นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 2000/3000 rpm นาน 2-3 นาที

2.2.3 แยกส่วนใสเก็บไว้ ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 2 อีกครั้ง นำส่วนใสที่สกัดได้รวมกัน ประมาณ 6 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มัล (ประมาณ 6-8 หยด) จนมีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3 ทดสอบด้วย TB paper (TB = thymol blue)

2.2.4 ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล (ประมาณ 4 หยด) จนมีค่าความเป็นกรดเบสระหว่าง 6.5-6.8 ทดสอบด้วย BTB paper (bromothymol blue) นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 2000/3000 rpm นาน 2-3 นาที

2.2.5 แยกส่วนใสเก็บไว้ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร นำกากที่เหลือมาเติมสารละลายเป็นกลางของกรดเปอร์คลอริค (ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.4, แช่เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 2000/3000 rpm นาน 2-3 นาที แยกส่วนใส ทิ้งตะกอน $KClO_4$

2.2.6 นำส่วนใสทั้งหมดมารวมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายเป็นกลางของกรดเปอร์คลอริค (ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.4, แช่เย็น) ก่อนนำมาทดสอบในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ หากจำเป็นต้องเก็บไว้ให้เทใส่หลอดแล้วปิดฝา แช่แข็งที่ – 20 องศาเซลเซียส

2.3 การหาค่า K

2.3.1 นำตัวอย่างที่สกัดไว้แล้ว 2 มิลลิลิตร มาปรับค่าความเป็นกรดเบสให้ได้ 9.4 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มัล (ใช้ pH paper)

2.3.2 นำตัวอย่างใส่ในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ กลั้วด้วยน้ำเล็กน้อย ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ไม่มีอิออน 20 มิลลิลิตร

2.3.3 ชะล้างด้วยสารละลาย A ปริมาตร 45-50 มิลลิลิตร ส่วนที่ได้เป็น HxR, Hx ใส่ใน ขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย A วัด OD ที่ 250 นาโนเมตร

2.3.4 ชะล้างด้วยสารละลาย B ปริมาตร 45-50 มิลลิลิตร ส่วนที่ได้จะเป็น ATP, ADP, AMP และ IMP ใส่ใน ขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยสารสารละลาย B วัด OD ที่ 250 นาโนเมตร

<u>การคำนวณ</u>

$$K(\%) = \frac{OD_{250nm}A}{OD_{250nm}A + OD_{250nm}B} \times 100$$

เมื่อ $OD_{250nm}A$ = [Absorbance ที่ 250 nm ของสารละลาย A- elute]- [Absorbance ที่ 250 nm ของสารละลาย A]

$OD_{250nm}B$ = [Absorbance ที่ 250 nm ของสารละลาย B- elute]- [Absorbance ที่ 250 nm ของสารละลาย B]

ภาคผนวกที่ ข5 การวัดปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) (Conway and Byrne, 1936)

1. สารเคมี

1.1 อินดิเคเตอร์ผสม : ละลายบรอมครีซอลกรีน 0.01 กรัม และ เมธิลเรด 0.02 กรัม ด้วยเอธานอล ร้อยละ 95 แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยเอธานอล ร้อยละ 95

1.2 Inner ring solution : ละลายกรดบอริค10 กรัม ในเอธานอล 200 มิลลิลิตร แล้วเติมอินดิเคเตอร์ผสม (ที่เตรียมจากข้อ 1) 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.3 สารละลายอิ่มตัวโปแตสเซียมคาร์บอเนต : ละลายโปแตสเซียมคาร์บอเนต 60 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ต้มประมาณ 10 นาที ทำให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง

1.4 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ร้อยละ 4 ละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 40 กรัม ในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร

1.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.02 นอร์มัล

2. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการบดละเอียดประมาณ 2 กรัม ชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน บดผสมกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ร้อยละ 4 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร โดยเครื่องปั่นผสม ควบคุมอุณหภูมิขณะปั่นด้วยน้ำแข็ง ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วย สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ร้อยละ 4

3. วิธีการทดลอง

3.1 ทาวาสลีนบางๆ บริเวณขอบฝาจานคอนเวย์

3.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในวงแหวนรอบนอกของจานคอนเวย์

3.3 ปิเปต inner ring solution 1 มิลลิลิตร ใส่ในวงกลมชั้นในของจาน

3.4 เอียงจานคอนเวย์เล็กน้อย แล้วจึงปิเปตสารละลายโปแตสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว 1 มิลลิลิตร ใส่ในวงแหวนรอบนอก คนละด้านกับสารละลายตัวอย่าง

3.5 ปิดฝาจานคอนเวย์ให้สนิทหมุนจานคอนเวย์เบาๆ ให้สารละลายตัวอย่างผสมกับด่าง

3.6 นำเข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

3.7 ไตเตรทสารละลายในวงกลมชั้นในด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.02 นอร์มัล จนกระทั่งสารละลายสีเขียวกลายเป็นสีชมพู บันทึกปริมาณกรดที่ใช้

3.8 ทำ blank โดยใช้ สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ร้อยละ 4 แทนตัวอย่าง แล้วดำเนินการเช่นเดียวกัน

<u>การคำนวณ</u>

TVB-N (มิลลิกรัม.ไนโตรเจน/100 กรัมตัวอย่าง)

$$= (V_S - V_B) \times (N_{HCl} \times A_N) \times \frac{\left[\left(W_S \times M/_{100}\right) + V_E\right] \times 100}{W_S}$$

เมื่อ V_S = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.02 นอร์มัล ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_N = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.02 นอร์มัล ที่ใช้ไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)

N_{HCl} = นอร์มัล ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริค (=0.02 นอร์มัล x factor ของกรดไฮโดรคลอริค)

A_N = น้ำหนักอะตอมของไนโตรเจน (14.00)

W_S = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

M = ร้อยละของความชื้นของตัวอย่าง

V_E = ปริมาตรของ สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ร้อยละ 4 ที่ใช้ในการสกัด

ภาคผนวกที่ ข6 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1995)

1. อุปกรณ์

1.1 ตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส
1.2 ภาชนะสำหรับหาความชื้น
1.3 โถดูดความชื้น
1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า

2. วิธีการทดลอง

2.1 อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2.2 ทำซ้ำข้อ 2.1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.3 ชั่งตัวอย่างอาหารที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 2-10 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้วนำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น รอให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น จากนั้นนำเข้าอบในตู้อบไฟฟ้าซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละของความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ภาคผนวกที่ ข 7 การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ (F.A.O., 1981)

1. สารเคมี

1. สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) 0.1 นอร์มัล
2. สารละลายโปแตสเซียมโครเมท (K_2CrO_4) ร้อยละ 5

2. วิธีการทดลอง

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลาที่ผ่านการบดด้วยเครื่องปั่น (blender) ประมาณ 2 กรัม เติมน้ำกลั่นพอประมาณปั่นให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีปั่น (Homoginizer) แล้วนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างมา 25 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตใส่ลง Elenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ดูดสารละลายโปแตสเซียมโครเมท ร้อยละ 5 ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 0.1 นอร์มัล ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองจนถึง จุดยุติ ซึ่งจะมีสีแดงอิฐเกิดขึ้น บันทึกปริมาตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ที่ใช้นำมาคำนวณหาร้อยละปริมาณเกลือ ทำ Blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละปริมาณเกลือ} = \frac{(Y-X) \times 5.85}{\text{น้ำหนัก ตัวอย่าง (กรัม)}}$$

Y = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 0.1 นอร์มัล ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

X = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 0.1 นอร์มัล ที่ใช้ไตเตรท blank

ภาคผนวกที่ ข8 การวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน (Hardy and Smith,1976)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ร้อยละ 2.5

1.2 สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์

1.3 Ambelite resin (CG-50, type 1, 100-200 mesh เกรดโครมาโตรกราฟฟี)

1.4 สารละลายบัฟเฟอร์ : เตรียมโดยผสมกรดอะซิติก 0.2 โมลาร์ กับสารละลายโซเดียมอะซิเตท 0.2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1

1.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.2 โมลาร์

1.6 สารละลายโซเดียมคาร์บอร์เนต ร้อยละ 5

1.7 สารละลาย diazotizing

1.8 พาราโบรโมอะนิลีน (p-bromoaniline)

1.9 สารละลายโซเดียมไนไตรท ร้อยละ 5

1.10 สารละลายฮีสตามีนมาตรฐาน

วิธีเตรียม

- ละลายพาราโบรโมอะนิลีน 0.894 กรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น ปริมาณ 9 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (เตรียมในอ่างน้ำแข็ง เพื่อให้อุณหภูมิของสารละลายเป็น 0 องศาเซลเซียส

- ปิเปตสารละลายมา 2 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง และเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ร้อยละ 5 (ที่แช่เย็นอุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

- ทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ร้อยละ 5 (ที่แช่เย็นอุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

- ทิ้งไว้ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

- สารละลายนี้ใช้ได้หลังปล่อยให้เสถียรนาน 15 นาที และควรใช้ภายใน 12 ชั่วโมง

1.8 สารละลายฮีสตามีนมาตรฐาน

- เตรียมสารละลายฮีสตามีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (ละลายฮีสตามีนไดไฮโดรคลอไรด์ 16.53 มิลลิกรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร) ปิเปต 2 มิลลิลิตร, 4 มิลลิลิตร, 6 มิลลิลิตร และ 8 มิลลิลิตร ของสารละลายนี้ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับ

ปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.2 โมลาร์ สารละลายนี้มีความเข้มข้นของฮีสตามีน 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

2. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม ปั่นกับ สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ร้อยละ 2.5 นาน 2 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

3. วิธีการทดลอง

3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่กรองได้ 25 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดเบสให้ได้ 7 ด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์

3.2 ชั่งเรซิน 1 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบรรจุลงคอลัมน์ (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 12 มิลลิเมตร) แล้วล้างเรซินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์อีก 150 มิลลิลิตร

3.3 นำสารละลายตัวอย่างที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสเรียบร้อยแล้วผ่านลงคอลัมน์

3.4 ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร150 มิลลิลิตร

3.5 ชะล้างฮีสตามีนด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.6 ทำ blank โดยปฏิบัติตามข้อ 3.1-3.5 แต่ใช้สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ร้อยละ 2.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง

3.7 ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอร์เนต ร้อยละ 5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดจุกแก้ที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วใส่ตัวอย่างที่ชะล้างได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.8 เติมสารละลาย diazotizing ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3.9 เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอ้างอิง (ต้องวัดหลังจากผสมแล้ว 10 นาที และห้ามเกิน 20 นาที)

4. การทำกราฟมาตรฐาน

4.1 ทำตามวิธีในข้อ 3.7- 3.9 โดยใช้สารละลายมาตรฐาน 4 ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

4.2 สร้างกราฟโดยใช้ความเข้มข้นของฮีสตามีนเป็นแกน X ค่าการดูดกลืนแสงเป็นแกน Y

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัม/100 กรัม)} = \frac{H(1000 + M)}{\text{น้ำหนัก ตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ภาคผนวกที่ ข9 การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ (Yamagata and Low, 1995)

1. สารเคมี

1.1 4-amino-3 hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (AHMT) ร้อยละ 0.5 : ชั่ง AHMT 0.5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.5 นอร์มัล

1.2 สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มัล : ชั่งโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 2.81 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.3 สารละลายโปแตสเซียมเปอร์ริโอเดต (KIO_4) ร้อยละ 0.75 : ชั่งโปแตสเซียมเปอร์ริโอเดต 0.75 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มัล

1.4 สารละลายซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) ร้อยละ 12 : ชั่งซิงค์ซัลเฟต 12 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.5 สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์มาตรฐาน (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

- ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ ร้อยละ 35 ปริมาตร 0.26 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ในการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ นำสารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มาทำให้เจือจางเป็นความเข้มข้น 0, 10. 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ppm)

1.6 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มัล : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. วิธีการทดลอง

3.1 ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มัล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบดด้วยโกร่งบด

3.2 เติมสารละลายซิงค์ซัลเฟต ร้อยละ 12 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบดต่อจนเข้ากัน

3.3 ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

3.4 ถ่ายสารละลายลงหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่อัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

3.5 กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

3.6 นำกากที่เหลือมาบดผสมกับน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่อัตราเร็ว 5,000รอบต่อนาที นาน 5 นาที กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารละลายที่กรองได้ไปรวมกับสารละลายที่กรองได้ในข้อ 3.5

3.7 นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดมาปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 4.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.1 นอร์มัล และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

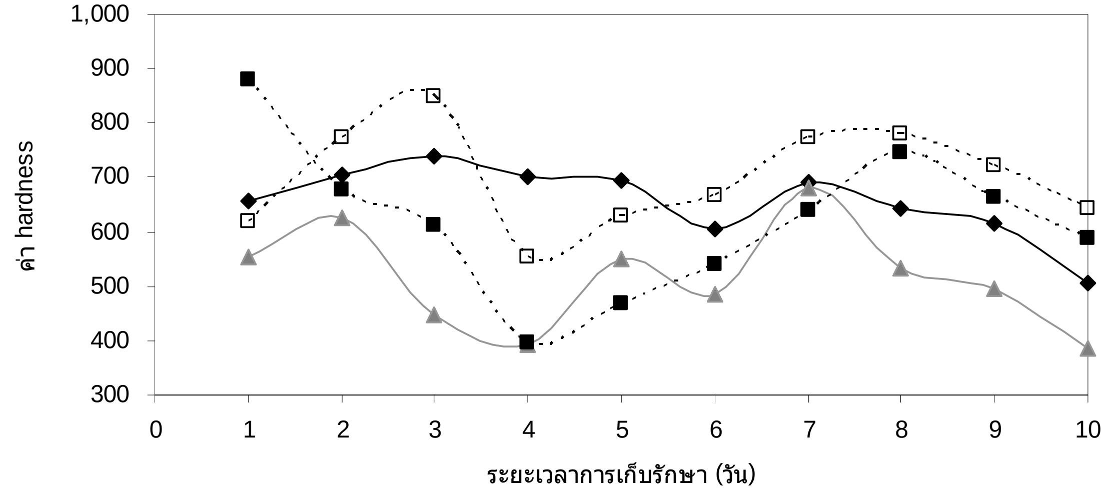
3.8 ปิเปตสารละลายที่สกัดได้มา 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มัล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ AHMT ร้อยละ 0.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

3.9 เติมสารละลายโปแตสเซียมเปอร์ริโอเดต ร้อยละ 0.75 เขย่าให้เข้ากัน จนเกิดสารละลายสีม่วง

3.10 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

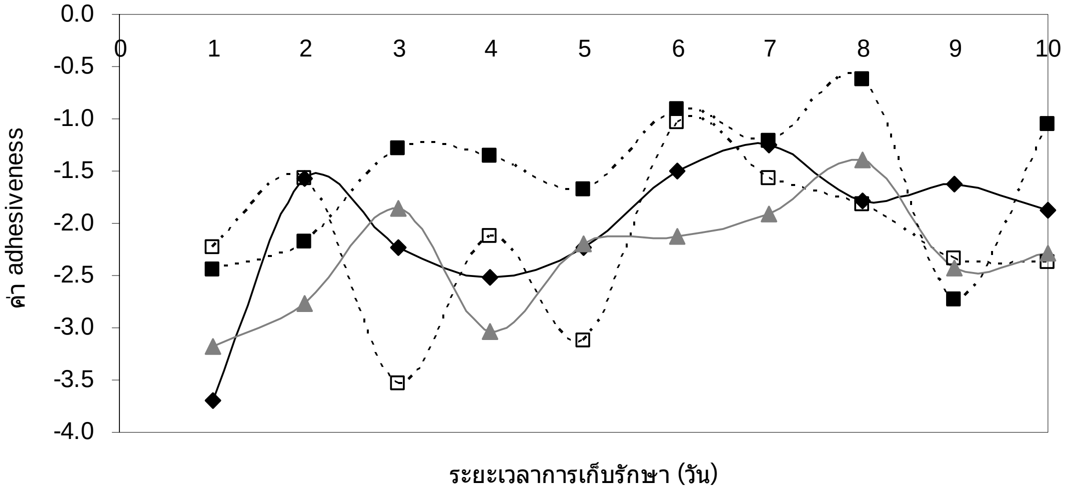
ภาคผนวก ค

ภาพผลการทดลองและตารางแสดงผลความแปรปรวนทางสถิติ



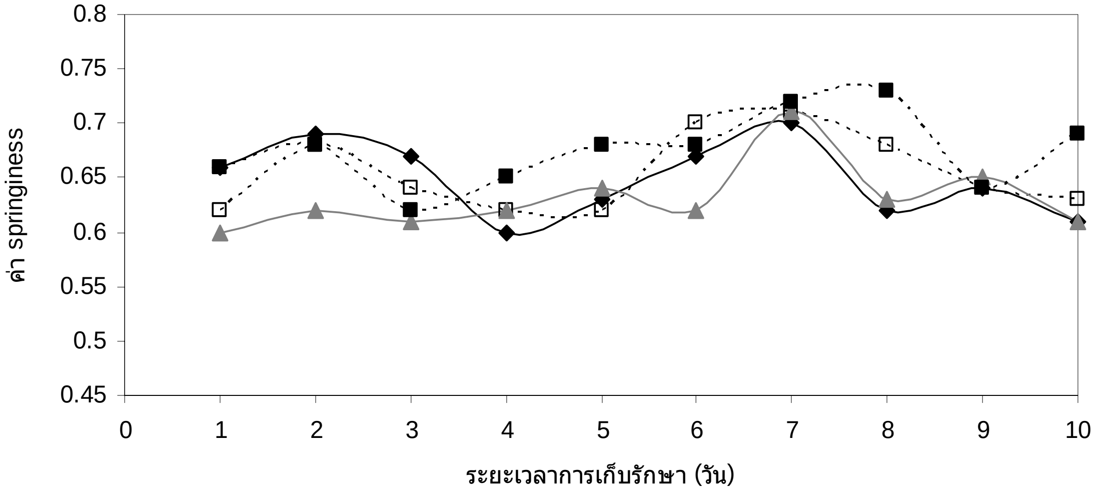
ภาพผนวกที่ ค1 การเปลี่ยนแปลงค่า Hardness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์



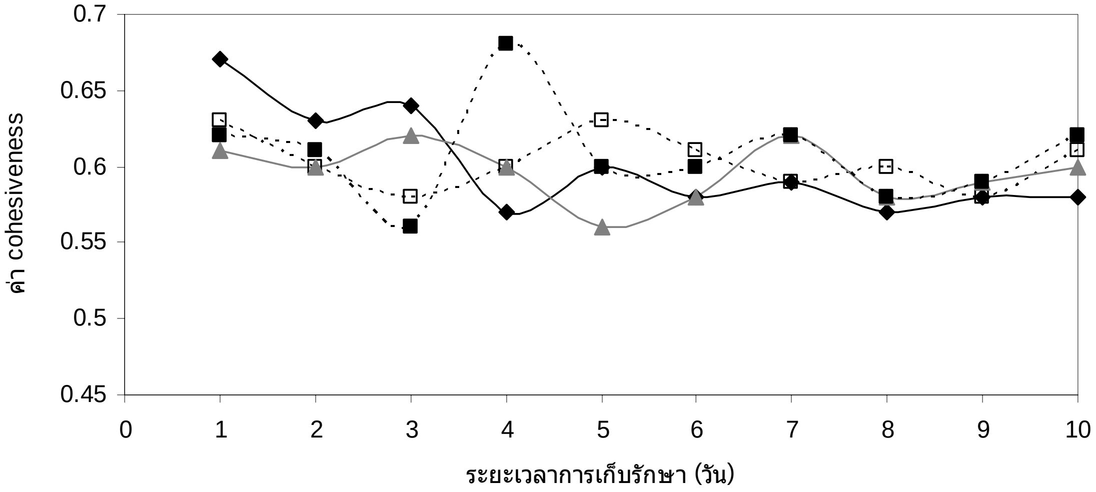
ภาพผนวกที่ ค2 การเปลี่ยนแปลงค่า Adhesiveness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์



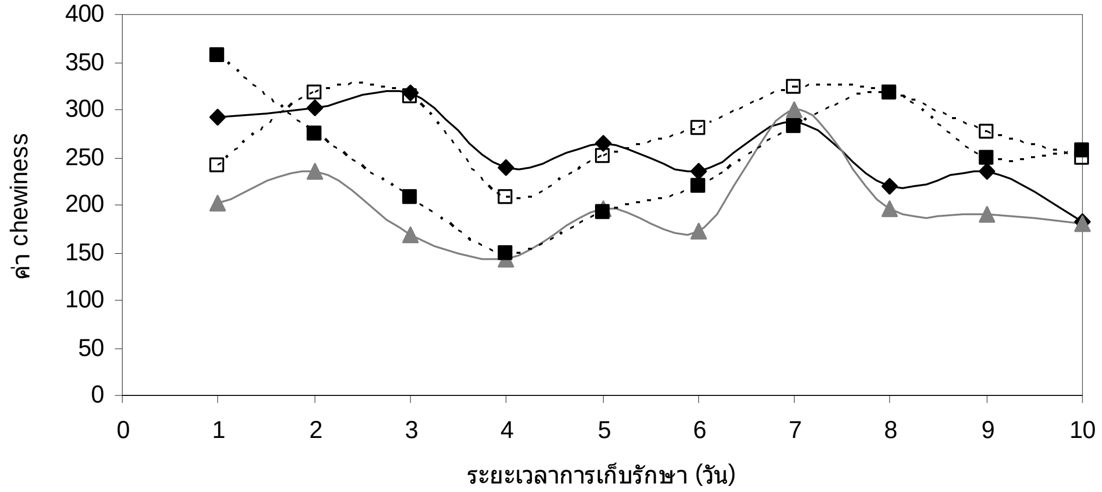
ภาพผนวกที่ ค3 การเปลี่ยนแปลงค่า Springiness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์



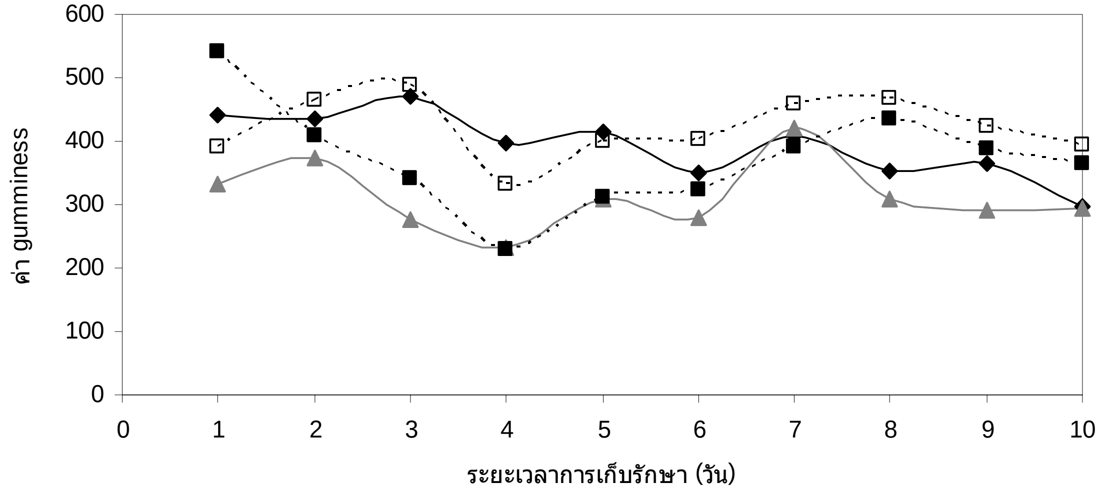
ภาพผนวกที่ ค4 การเปลี่ยนแปลงค่า Cohesiveness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์



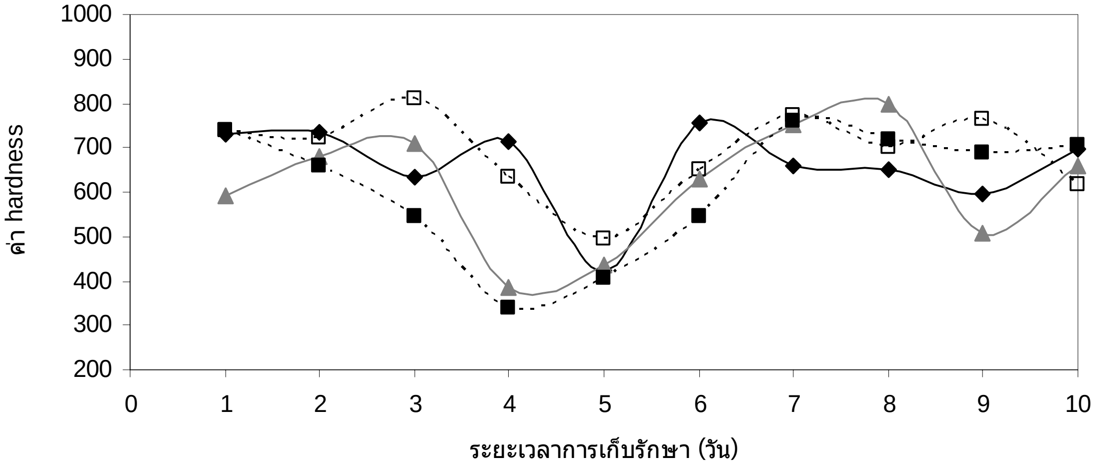
ภาพผนวกที่ ค5 การเปลี่ยนแปลงค่า Chewiness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์



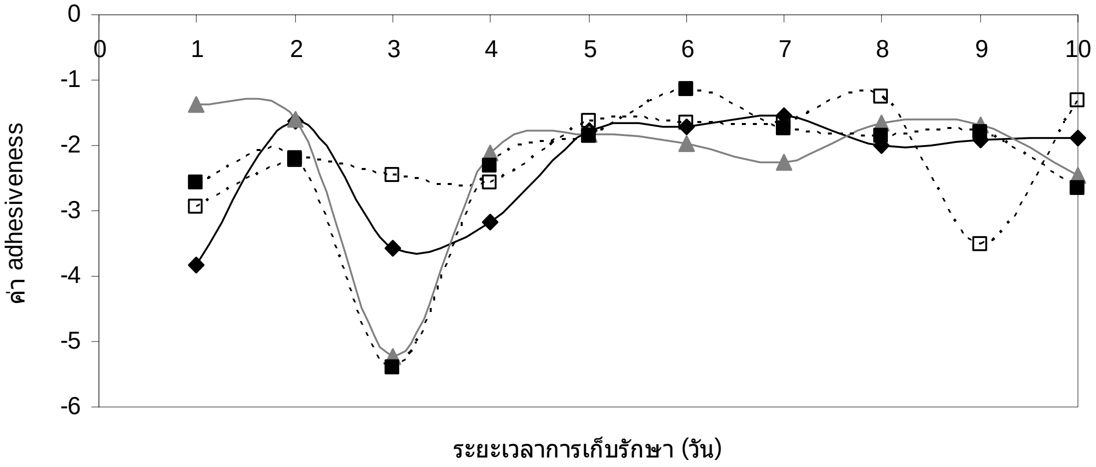
ภาพผนวกที่ ค6 การเปลี่ยนแปลงค่า Gumminess ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 20 มิลลิโมลาร์ —▲— 30 มิลลิโมลาร์ --■-- 40 มิลลิโมลาร์



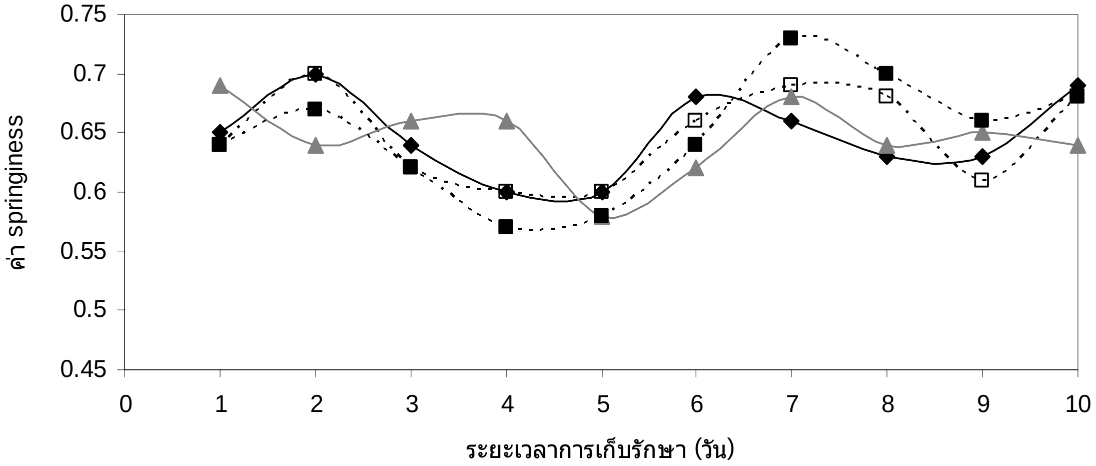
ภาพผนวกที่ ค7 การเปลี่ยนแปลงค่า Hardness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ต่างกัน

น้ำเย็น --15 มิลลิโมลาร์ 25 มิลลิโมลาร์ -- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



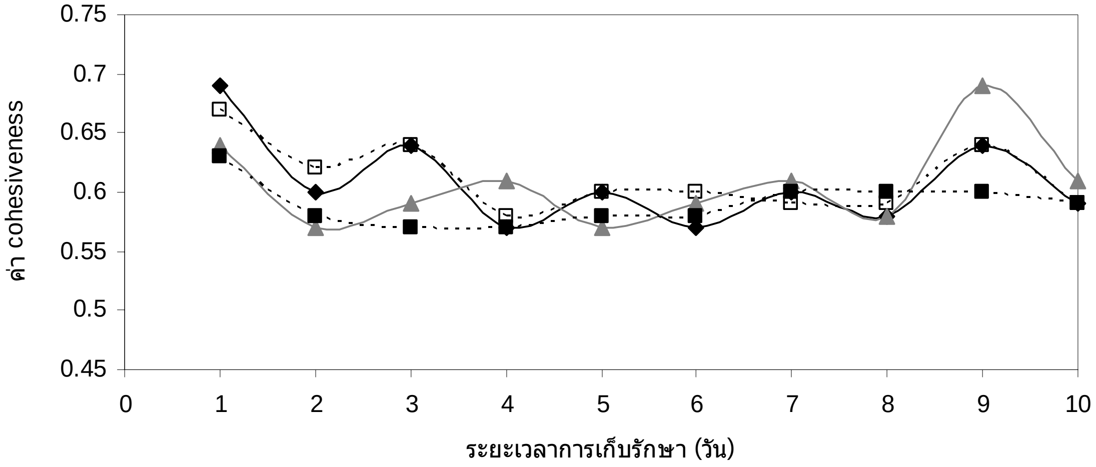
ภาพผนวกที่ ค8 การเปลี่ยนแปลงค่า Adhesiveness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ต่างกัน

น้ำเย็น --15 มิลลิโมลาร์ 25 มิลลิโมลาร์ -- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



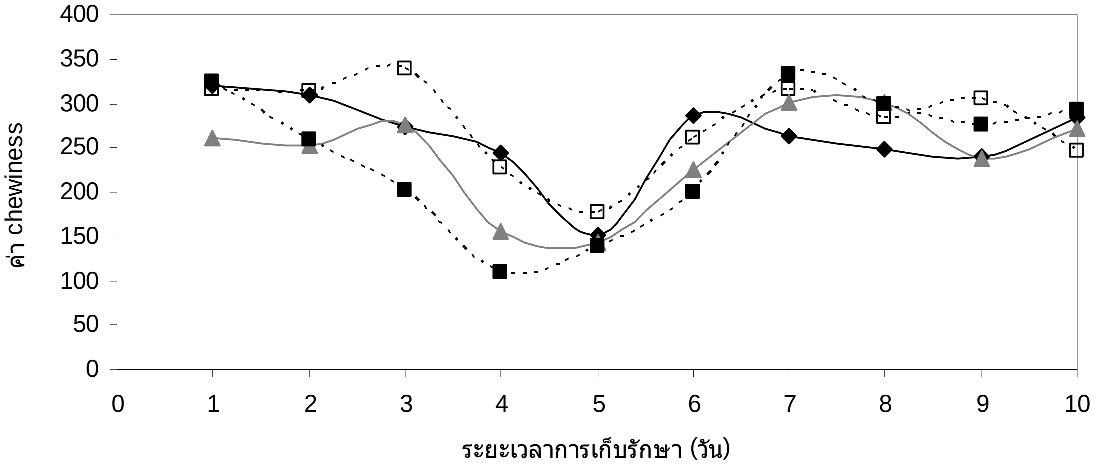
ภาพผนวกที่ ค9 การเปลี่ยนแปลงค่า Springiness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



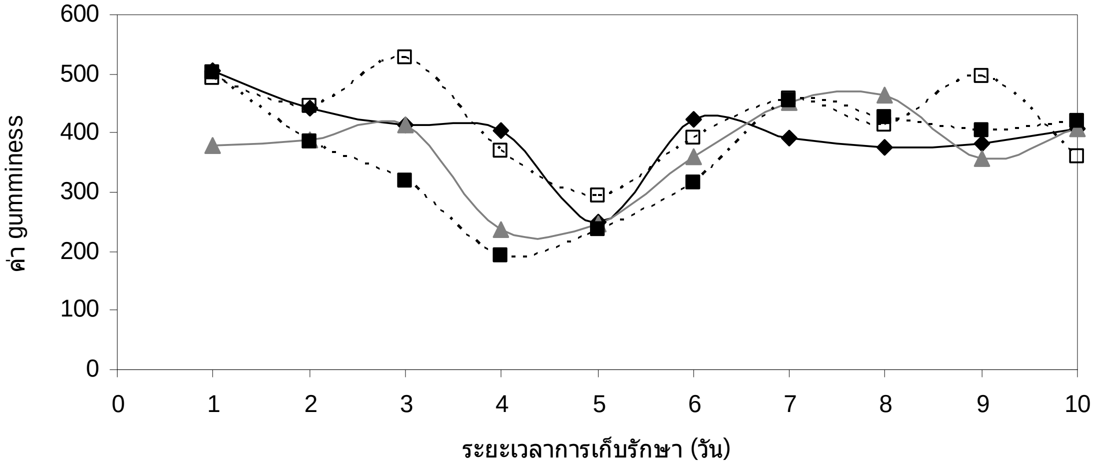
ภาพผนวกที่ ค10 การเปลี่ยนแปลงค่า Cohesiveness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ต่างกัน

—◆— น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



ภาพผนวกที่ ค11 การเปลี่ยนแปลงค่า Chewiness ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์



ภาพผนวกที่ ค12 การเปลี่ยนแปลงค่า Gumminess ของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ต่างกัน

น้ำเย็น --□-- 15 มิลลิโมลาร์ —▲— 25 มิลลิโมลาร์ --■-- EDTA 40 มิลลิโมลาร์

ตารางผนวกที่ ค1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่า K ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ค่าความเป็นกรดเบส ปริมาณความชื้น ปริมาณเกลือของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ค่า K	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	366.7702	183.3851	245.00^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	789.9618	131.6603	175.90^{**}
	A x B	12	1019.8404	84.9867	113.54^{**}
	Error	36	26.1980	0.7485	
ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	1.60966704	0.80483352	10.07^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	52.89796413	8.81632736	110.35^{**}
	A x B	12	2.40394047	0.20032837	2.51^{*}
	Error	36	2.87628778	0.07989688	
ความเป็นกรดเบส	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	0.01566032	0.00783016	212.94^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	0.42716508	0.07119418	1936.07^{**}
	A x B	12	0.02013968	0.00167831	45.64^{**}
	Error	36	0.00132381	0.00003677	
ปริมาณความชื้น	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	0.30729841	0.15364921	2.55^{ns}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	0.14036508	0.02339418	1.26^{ns}
	A x B	12	0.30130159	0.02510847	1.35^{ns}
	Error	36	0.66810476	0.01855847	
ปริมาณเกลือ	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	0.00108173	0.00054087	0.20^{ns}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	0.00925805	0.00154301	0.56^{ns}
	A x B	12	0.09518934	0.00793244	2.89^{ns}
	Error	36	0.09864824	0.00274023	

^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่มสด และปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
กระดองและลำตัวของปูนิ่มสด	ผู้ทดสอบ	9	2.38767	0.26530	1.28^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	4.60467	2.30233	11.13**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	292.93162	48.82194	235.95**
	A x B	12	3.62467	0.30206	1.46^{ns}
	Error	162	33.52086	0.20692	
กลิ่นของปูนิ่มสด	ผู้ทดสอบ	9	2.65052	0.29450	1.23^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	20.26324	10.13162	42.29**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	224.54114	37.42352	156.22**
	A x B	12	9.49943	0.79162	3.30**
	Error	162	38.80800	0.23956	
เนื้อปูนิ่มนึ่ง	ผู้ทดสอบ	9	3.71067	0.41230	2.03^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	8.45210	4.22605	20.84**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	205.61781	34.26963	168.97**
	A x B	12	6.09790	0.50816	2.51^{ns}
	Error	162	32.85571	0.20281	
กลิ่นปูนิ่มนึ่ง	ผู้ทดสอบ	9	5.03814	0.55979	2.72^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	16.30438	8.15219	39.65**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	183.90095	30.65016	149.07**
	A x B	12	5.56762	0.46397	2.26^{ns}
	Error	162	33.30857	0.20561	

^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของปูนิ่มสดที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ลักษณะปรากฏ	ผู้ทดสอบ	9	4.73243	0.52583	2.18^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	46.92371	23.46186	97.19**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	679.38829	113.23138	469.08**
	A x B	12	46.61229	3.88436	16.09**
	Error	162	39.10514	0.24139	
สีกระดอง	ผู้ทดสอบ	9	8.65357	0.96151	4.10 ^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	52.02857	26.01429	111.05**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	664.12857	110.68810	472.50**
	A x B	12	45.92143	3.82679	16.34**
	Error	162	37.95000	0.23426	
สีเปลือกด้านท้อง	ผู้ทดสอบ	9	5.69524	0.63280	2.47 ^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	5.85000	2.92500	11.44**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	757.28095	126.21349	493.62**
	A x B	12	26.58333	2.21528	8.66**
	Error	162	41.42143	0.25569	
กลิ่น	ผู้ทดสอบ	9	3.47738	0.38638	1.57 ^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	57.04524	28.52262	115.95**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	565.77857	94.29643	383.34**
	A x B	12	39.87143	3.32262	13.5**
	Error	162	39.85000	0.24599	

ตารางผนวกที่ ค3 (ต่อ)

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
เนื้อสัมผัส	ผู้ทดสอบ	9	5.60595238	0.62288360	3.00 ns
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	28.28809524	14.14404762	68.08**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	633.82380952	105.63730159	508.46**
	A x B	12	21.66190476	1.80515873	8.69**
	Error	162	33.65714286	0.20776014	
ความชอบรวม	ผู้ทดสอบ	9	5.07142857	0.56349206	2.27 ns
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	7.92380952	3.96190476	15.94 **
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	616.17857143	102.69642857	413.12**
	A x B	12	7.69285714	0.64107143	2.58*
	Error	162	40.27142857	0.24858907	

ns มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของปูนิ่มนึ่งที่สภาวะการเก็บรักษาต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ลักษณะปรากฏ	ผู้ทดสอบ	9	1.57281	0.17476	0.71 ns
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	48.62295	24.31148	99.42**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	815.28314	135.88052	555.67**
	A x B	12	26.96771	2.24731	9.19 ns
	Error	162	39.61486	0.24454	
สี	ผู้ทดสอบ	9	4.62100000	0.51344444	2.01 ns
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	6.14466667	3.07233333	12.05**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	308.71780952	51.45296825	201.77**
	A x B	12	13.26133333	1.10511111	4.33**
	Error	162	41.31228571	0.25501411	
กลิ่น	ผู้ทดสอบ	9	4.51981	0.50220	1.68 ns
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	37.71800	18.85900	63.14**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	727.73067	121.28844	406.04**
	A x B	12	14.84133	1.23678	4.14 ns
	Error	162	48.39086	0.29871	
เนื้อสัมผัส	ผู้ทดสอบ	9	6.48690	0.72077	1.37 ns
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	57.56429	28.78214	54.56**
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	631.19524	105.19921	199.41**
	A x B	12	28.26905	2.35575	4.47**
	Error	162	85.46429	0.52756	

ตารางผนวกที่ ค4 (ต่อ)

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
รสชาติ	ผู้ทดสอบ	9	3.74933333	0.41659259	1.31 ^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	1.72466667	0.86233333	2.71 **
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	415.90447619	69.31741270	217.78 **
	A x B	12	7.62466667	0.63538889	2.00 *
	Error	162	51.56228571	0.31828571	
ความชอบรวม	ผู้ทดสอบ	9	3.05695	0.33966	0.98 ^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา (A)	2	6.84752	3.42376	9.85 **
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	873.19495	145.53249	418.51 **
	A x B	12	7.54848	0.62904	1.81 ^{ns}
	Error	162	56.33371	0.34774	

^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ความเป็นกรดเบส และการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ปริมาณด่าง	ความเข้มข้น (A)	3	0.169714	0.1691654	0.969*
ที่ระเหยได้ทั้งหมด	เวลาเก็บรักษา (B)	9	491.733463	28.9258367	165.975**
	A x B	27	35.5732256	2.0932418	12.007**
	Error	72	12.5481243	0.1744563	
ความเป็นกรดเบส	ความเข้มข้น (A)	3	0.67418000	0.22472667	214.42**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	4.11668000	0.45740889	436.44**
	A x B	27	0.39162000	0.01450444	13.84**
	Error	72	0.07546000	0.00104806	
การสูญเสีย	ความเข้มข้น (A)	3	82.94093583	27.64697861	194.66**
น้ำหนัก	เวลาเก็บรักษา (B)	9	22606.51911	2511.835457	17685.19**
	A x B	27	36.98883917	1.36995701	9.65**
	Error	72	10.22619333	0.14203046	

ns มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าสีปูนิ่มสดและสีปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA เข้มข้นต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ค่า L* ปูนิ่มสด	ความเข้มข้น (A)	3	31.75670667	10.58556889	10.75^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	807.24793667	89.69421519	91.10^{**}
	A x B	27	27.71941000	1.02664481	1.04^{ns}
	Error	72	70.89185333	0.98460907	
ค่า a* ปูนิ่มสด	ความเข้มข้น (A)	3	3.26957583	1.08985861	7.49^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	50.63923750	5.62658194	38.68^{**}
	A x B	27	0.84883250	0.03143824	0.22^{ns}
	Error	72	10.47248000	0.14545111	
ค่า b* ปูนิ่มสด	ความเข้มข้น (A)	3	32.20898250	10.73632750	24.25^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	465.10120750	51.67791194	116.71^{**}
	A x B	27	17.77100917	0.65818552	1.49^{ns}
	Error	72	31.88015333	0.44277991	
ค่า L* ปูนิ่มนึ่ง	ความเข้มข้น (A)	3	195.98796000	65.32932000	44.19^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1432.58984667	159.17664963	107.68^{**}
	A x B	27	70.61494000	2.61536815	1.77^{ns}
	Error	72	106.43333333	1.47824074	
ค่า a* ปูนิ่มนึ่ง	ความเข้มข้น (A)	3	94.92045667	31.64015222	34.00^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1285.95121333	142.88346815	153.55^{**}
	A x B	27	31.80112667	1.17781951	1.27^{ns}
	Error	72	66.99672000	0.93051000	
ค่า b* ปูนิ่มนึ่ง	ความเข้มข้น (A)	3	683.78362250	227.92787417	107.74^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	2851.47995417	316.83110602	149.76^{**}
	A x B	27	63.27403583	2.34348281	1.11^{ns}
	Error	72	152.31966000	2.11555083	

^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ตารางผนวกที่ ค7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าเนื้อสัมผัสเฉลี่ยของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
Hardness	ความเข้มข้น (A)	3	990730.1315	330243.3771	16.34**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1842966.9940	204774.11044	10.13**
	A x B	27	1118501.85665	41425.994690	2.05ns
	Error	180	3638578.9624	20214.3275	
Adhesiveness	ความเข้มข้น (A)	3	18.13651302	6.04550434	3.49*
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	49.99645824	5.55516203	3.21**
	A x B	27	47.54359021	1.76087371	1.02ns
	Error	180	311.4996822	1.73055379	
Cohesiveness	ความเข้มข้น (A)	3	0.38739094	0.12913031	1.04ns
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1.01626370	0.11291819	0.91ns
	A x B	27	3.34380768	0.12384473	1.00ns
	Error	180	22.2972192	0.12387344	
Gumminess	ความเข้มข้น (A)	3	366351.3206	122117.1068	17.21**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	767306.8732	85256.31924	12.02**
	A x B	27	408932.3085	15145.6410	2.13**
	Error	180	1277017.0686	7094.5392	

ตารางผนวกที่ ค7 (ต่อ)

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
Springiness	ความเข้มข้น (A)	3	1.18170763	0.39390254	1.95[ns]
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	2.33201027	0.25911225	1.28[ns]
	A x B	27	4.43871301	0.16439678	0.82[ns]
	Error	180	36.31599	0.20170555	
Chewiness	ความเข้มข้น (A)	3	151900.423243	50633.474414	9.79**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	520822.291613	57869.143512	11.19**
	A x B	27	285149.11537	10561.078347	2.04**
	Error	180	930997.857	5172.2103194	

[ns] มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่มสด และปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
กระดองและลำตัว	ผู้ทดสอบ	9	2.07750000	0.23083333	1.38 ns
ของปูนิ่มสด	ความเข้มข้น (A)	3	67.82750000	22.60916667	135.40**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	555.36500000	61.70722222	369.56**
	A x B	27	28.98500000	1.07351852	6.43**
	Error	324	54.10000000	0.16697531	
กลิ่นของปูนิ่มสด	ผู้ทดสอบ	9	2.69312500	0.29923611	1.77 ns
	ความเข้มข้น (A)	3	34.80687500	11.60229167	68.49**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	503.93062500	55.99229167	330.55**
	A x B	27	14.16187500	0.52451389	3.10**
	Error	324	54.88250000	0.16939043	
เนื้อปูนิ่มนึ่ง	ผู้ทดสอบ	9	16.46010000	1.82890000	12.14**
	ความเข้มข้น (A)	3	50.66590000	16.88863333	112.09**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	520.98010000	57.88667778	384.18**
	A x B	27	11.97310000	0.44344815	2.94**
	Error	324	48.81880000	0.15067531	
กลิ่นปูนิ่มนึ่ง	ผู้ทดสอบ	9	10.92752500	1.21416944	6.28**
	ความเข้มข้น (A)	3	68.18727500	22.72909167	117.62**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	541.86252500	60.20694722	311.55**
	A x B	27	23.44397500	0.86829537	4.49**
	Error	324	62.61250000	0.19324846	

ns มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ลักษณะปรากฏ	ผู้ทดสอบ	9	15.19312500	1.68812500	1.36^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	78.62187500	26.20729167	21.17^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1334.78062500	148.30895833	745.31^{**}
	A x B	27	33.42187500	1.23784722	6.22^{**}
	Error	324	64.47250000	0.19898920	
สีกระดอง	ผู้ทดสอบ	9	5.75250000	0.63916667	0.96^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	53.92500000	17.97500000	27.09^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1615.55250000	179.50583333	788.23^{**}
	A x B	27	17.91250000	0.66342593	2.91^{**}
	Error	324	73.78500000	0.22773148	
สีเปลือกด้านท้อง	ผู้ทดสอบ	9	6.16250000	0.68472222	0.82^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	58.04750000	19.34916667	23.19^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1474.46250000	163.82916667	730.03^{**}
	A x B	27	22.52750000	0.83435185	3.72^{**}
	Error	324	72.71000000	0.22441358	
กลิ่น	ผู้ทดสอบ	9	5.35062500	0.59451389	0.68^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	59.70187500	19.90062500	22.68^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1820.70062500	202.30006944	791.78^{**}
	A x B	27	23.69187500	0.87747685	3.43^{**}
	Error	324	82.78250000	0.25550154	

ตารางผนวกที่ ค9 (ต่อ)

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
เนื้อสัมผัส	ผู้ทดสอบ	9	3.68062500	0.40895833	0.83^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	35.15187500	11.71729167	23.85**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	2253.93062500	250.43673611	782.63**
	A x B	27	13.26687500	0.49136574	1.54*
	Error	324	103.67750000	0.31999228	
ความชอบรวม	ผู้ทดสอบ	9	7.77250000	0.86361111	1.44^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	49.52250000	16.50750000	27.61**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	2180.63500000	242.29277778	857.72**
	A x B	27	16.14000000	0.59777778	2.12**
	Error	324	91.52500000	0.28248457	

^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้นต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ลักษณะปรากฏ	ผู้ทดสอบ	9	4.03750000	0.44861111	0.90^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	2	29.96750000	9.98916667	20.21^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	2184.762500	242.75138889	1037.21^{**}
	A x B	12	13.40750000	0.49657407	2.12^{**}
	Error	324	75.83000000	0.23404321	
สี	ผู้ทดสอบ	9	5.59750000	0.62194444	0.48^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	2	48.65000000	16.21666667	12.43^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	1763.97250000	195.99694444	752.05^{**}
	A x B	12	35.23750000	1.30509259	5.01^{**}
	Error	324	84.44000000	0.26061728	
กลิ่น	ผู้ทดสอบ	9	3.98302500	0.44255833	0.91^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	2	40.58667500	13.52889167	27.78^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	1530.09802500	170.01089167	669.60^{**}
	A x B	12	13.15007500	0.48703981	1.92^{**}
	Error	324	82.26290000	0.25389784	
เนื้อสัมผัส	ผู้ทดสอบ	9	2.57562500	0.28618056	0.34^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	2	65.81187500	21.93729167	26.40^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	1752.45062500	194.71673611	694.10^{**}
	A x B	12	22.43187500	0.83081019	2.96^{**}
	Error	324	90.89250000	0.28053241	

ตารางผนวกที่ ค10 (ต่อ)

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
รสชาติ	ผู้ทดสอบ	9	5.45250000	0.60583333	1.14^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา	2	17.02750000	5.67583333	13.50**
	(A)	6	2072.50250000	230.27805556	841.63**
	เวลาเก็บรักษา (B)	12	11.34750000	0.42027778	1.54*
	A x B	324	88.65000000	0.27361111	
	Error Error				
ความชอบรวม	ผู้ทดสอบ	9	9.78002500	1.08666944	1.18^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา	2	60.40767500	20.13589167	21.95**
	(A)	6	1881.11002500	209.01222500	801.07**
	เวลาเก็บรักษา (B)	12	24.77407500	0.91755833	3.52**
	A x B	324	84.53690000	0.26091636	
	Error				

^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.01)

ตารางผนวกที่ ค11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ความเป็นกรดเบส และการสูญเสียน้ำหนักของปูนิ่มที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ปริมาณด่าง	ความเข้มข้น (A)	3	0.169	0.169	0.969^{ns}
ที่ระเหยได้ทั้งหมด	เวลาเก็บรักษา (B)	9	491.73	28.925	165.975^{**}
	A x B	27	35.573	2.093	12.007^{**}
	Error	72	12.548	0.174	
ความเป็นกรดเบส	ความเข้มข้น (A)	3	0.67418	0.22472667	214.42^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	4.11668	0.45740889	436.44^{**}
	A x B	27	0.39162	0.01450444	13.84^{**}
	Error	72	0.07546	0.00104806	
การสูญเสีย	ความเข้มข้น (A)	3	191.94835583	63.98278528	143.96^{**}
น้ำหนัก	เวลาเก็บรักษา (B)	9	22422.50591750	2491.38954639	5605.67^{**}
	A x B	27	80.12215250	2.96748713	6.68^{**}
	Error	72	31.99974000	0.44444083	

^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าสีปูนิ่มสดและสีปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ค่า L* ปูนิ่มสด	ความเข้มข้น (A)	3	267.97516000	89.32505333	140.72**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	2157.36829667	239.70758852	377.62**
	A x B	27	62.92429000	2.33052926	3.67**
	Error	72	45.70465333	0.63478685	
ค่า a* ปูนิ่มสด	ความเข้มข้น (A)	3	3.14579667	1.04859889	7.99**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	36.68214667	4.07579407	31.04**
	A x B	27	1.58232000	0.05860444	0.45ns
	Error	72	9.45409333	0.13130685	
ค่า b* ปูนิ่มสด	ความเข้มข้น (A)	3	70.44254917	23.48084972	70.27**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	421.28630083	46.80958898	140.08**
	A x B	27	9.99924250	0.37034231	1.11ns
	Error	72	24.06008667	0.33416787	
ค่า L* ปูนิ่มนึ่ง	ความเข้มข้น (A)	3	347.11828667	115.70609556	129.44**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1368.75478667	152.08386519	170.13**
	A x B	27	23.92924667	0.88626840	0.99ns
	Error	72	64.36128667	0.89390676	
ค่า a* ปูนิ่มนึ่ง	ความเข้มข้น (A)	3	152.77385000	50.92461667	84.51**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1597.27076333	177.47452926	294.51**
	A x B	27	62.91798333	2.33029568	3.87**
	Error	72	43.38803333	0.60261157	
ค่า b* ปูนิ่มนึ่ง	ความเข้มข้น (A)	3	195.98796000	65.32932000	42.19**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1432.58984667	159.17664963	105.52**
	A x B	27	70.61494000	2.61536815	1.76ns
	Error	72	106.43333333	1.47824074	

ns มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.01)

ตารางผนวกที่ ค13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าเนื้อสัมผัสเฉลี่ยของเนื้อปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
Hardness	ความเข้มข้น (A)	3	529628.420277	176542.80675	3.54*
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	37101.0964003	181900.12182	3.65**
	A x B	27	1566882.48365	58032.684579	1.17ns
	Error	180	8965150.4344	49806.391387	
Adhesiveness	ความเข้มข้น (A)	3	2981.84828262	993.94942754	1.29ns
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	6835.01118085	759.44568676	0.99ns
	A x B	27	20248.1878338	749.93288274	0.97ns
	Error	180	138685.9239	770.47735517	
Cohesiveness	ความเข้มข้น (A)	3	0.26983137	0.08994379	1.09ns
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	0.74369157	0.08263240	1.00ns
	A x B	27	2.31408513	0.08570686	1.04ns
	Error	180	14.82382630	0.08235459	
Gumminess	ความเข้มข้น (A)	3	147061.801514	49020.600504	2.57ns
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	901087.611327	100120.84570	5.26**
	A x B	27	461787.500910	17103.240774	0.90ns
	Error	180	3427882.603	19043.792245	

ตารางผนวกที่ ค13 (ต่อ)

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
Springiness	ความเข้มข้น (A)	3	73.95852219	24.65284073	1.03[ns]
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	203.67186569	22.63020730	0.95[ns]
	A x B	27	636.90694334	23.58914605	0.99[ns]
	Error	180	4299.958597	23.88865887	
Chewiness	ความเข้มข้น (A)	3	118418.16515	39472.7217178	3.76[*]
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	571862.46324	63540.2736943	6.05[**]
	A x B	27	335226.91565	12415.811690	1.18[ns]
	Error	180	1891193.5910	10506.6310606	

[ns] มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

[*] มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

[**] มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนการแบ่งชั้นคุณภาพปูนิ่มสดและปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
กระดองและลำตัวของปูนิ่มสด	ผู้ทดสอบ	9	1.19312500	0.13256944	0.15^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	63.24187500	21.08062500	24.12^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	440.48062500	48.94229167	298.67^{**}
	A x B	27	23.60187500	0.87414352	5.33^{**}
	Error	324	53.09250000	0.16386574	
กลิ่นของปูนิ่มสด	ผู้ทดสอบ	9	1.86250000	0.20694444	0.44^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	33.90750000	11.30250000	23.81^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	491.91250000	54.65694444	360.16^{**}
	A x B	27	12.81750000	0.47472222	3.13^{**}
	Error	324	49.17000000	0.15175926	
เนื้อปูนิ่มนึ่ง	ผู้ทดสอบ	9	3.74000000	0.41555556	0.45^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	58.34250000	19.44750000	21.22^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	483.64000000	53.73777778	310.00^{**}
	A x B	27	24.74500000	0.91648148	5.29^{**}
	Error	324	56.16500000	0.17334877	
กลิ่นปูนิ่มนึ่ง	ผู้ทดสอบ	9	0.48062500	0.05340278	0.06^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	75.73687500	25.24562500	29.21^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	493.98062500	54.88673611	304.97^{**}
	A x B	27	23.33187500	0.86414352	4.80^{**}
	Error	324	58.31250000	0.17997685	

^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ปูนิ่มสดที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ลักษณะปรากฏ	ผู้ทดสอบ	9	13.90250000	1.54472222	1.60^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	80.48750000	26.82916667	27.87^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1360.40250000	151.15583333	740.80^{**}
	A x B	27	25.98750000	0.96250000	4.72^{**}
	Error	324	66.11000000	0.20404321	
สีกระดอง	ผู้ทดสอบ	9	1.65250000	0.18361111	0.33^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	34.54750000	11.51583333	20.90^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1635.65250000	181.73916667	736.32^{**}
	A x B	27	14.87750000	0.55101852	2.23^{**}
	Error	324	79.97000000	0.24682099	
สีเปลือกด้านท้อง	ผู้ทดสอบ	9	1.90250000	0.21138889	0.19^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	64.22750000	21.40916667	18.92^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1452.60250000	161.40027778	830.72^{**}
	A x B	27	30.54750000	1.13138889	5.82^{**}
	Error	324	62.95000000	0.19429012	
กลิ่น	ผู้ทดสอบ	9	3.12562500	0.34729167	0.45^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	3	41.35687500	13.78562500	17.95^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	1743.82562500	193.75840278	796.55^{**}
	A x B	27	20.73687500	0.76803241	3.16^{**}
	Error	324	78.81250000	0.24324846	

ตารางผนวกที่ ค15 (ต่อ)

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
เนื้อสัมผัส	ผู้ทดสอบ	9	1.86000000	0.20666667	0.42[ns]
	ความเข้มข้น (A)	3	40.38500000	13.46166667	27.53**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	2113.22250000	234.80250000	802.28**
	A x B	27	13.20250000	0.48898148	1.67*
	Error	324	94.82500000	0.29266975	
ความชอบรวม	ผู้ทดสอบ	9	4.99000000	0.55444444	1.12**
	ความเข้มข้น (A)	3	28.61250000	9.53750000	19.22**
	เวลาเก็บรักษา (B)	9	2067.76500000	229.75166667	916.91**
	A x B	27	13.40000000	0.49629630	1.98**
	Error	324	81.18500000	0.25057099	

[ns] มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ตารางผนวกที่ ค16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนความชอบคุณลักษณะต่าง ๆ ปูนิ่มนึ่งที่แช่ในสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่างกัน

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
ลักษณะปรากฏ	ผู้ทดสอบ	9	2.95562500	0.32840278	1.16^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	2	36.33187500	12.11062500	42.96^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	2147.48062500	238.60895833	1041.45^{**}
	A x B	12	7.61187500	0.28192130	1.23^{ns}
	Error	324	74.23250000	0.22911265	
สี	ผู้ทดสอบ	9	3.76250000	0.41805556	0.46^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	2	40.74750000	13.58250000	15.11^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	1708.61250000	189.84583333	706.93^{**}
	A x B	12	24.27750000	0.89916667	3.35^{**}
	Error	324	87.01000000	0.26854938	
กลิ่น	ผู้ทดสอบ	9	2.81250000	0.31250000	0.49^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	2	47.84750000	15.94916667	25.00^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	1443.56250000	160.39583333	682.80^{**}
	A x B	12	17.22750000	0.63805556	2.72^{**}
	Error	324	76.11000000	0.23490741	
เนื้อสัมผัส	ผู้ทดสอบ	9	1.16562500	0.12951389	0.18^{ns}
	ความเข้มข้น (A)	2	83.71187500	27.90395833	38.28^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	6	1655.79062500	183.97673611	731.37^{**}
	A x B	12	19.68187500	0.72895833	2.90^{**}
	Error	324	81.50250000	0.25155093	

ตารางผนวกที่ ค16 (ต่อ)

ลักษณะที่ทดสอบ	SOV	df	SS	MS	F
รสชาติ	ผู้ทดสอบ	9	7.35562500	0.81729167	1.01^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา	2	23.76187500	7.92062500	7.98^{**}
	(A)	6	1933.25562500	214.80618056	848.62^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	12	21.85687500	0.80951389	3.20^{**}
	A x B	324	82.01250000	0.25312500	
	Error				
ความชอบรวม	ผู้ทดสอบ	9	7.35562500	0.81729167	1.01^{ns}
	สภาวะเก็บรักษา	2	23.76187500	7.92062500	9.78^{**}
	(A)	6	1933.25562500	214.80618056	848.62^{**}
	เวลาเก็บรักษา (B)	12	21.85687500	0.80951389	3.20^{**}
	A x B	324	82.01250000	0.25312500	
	Error				

^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.01$)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสวามินี ธีระวุฒิ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 17 สิงหาคม 2520
สถานที่เกิด	พระนครศรีอยุธยา
ประวัติการศึกษา	2543 วิทยาศาสตรบัณฑิต (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
	2546 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	พนักงานมหาวิทยาลัย (อาจารย์)
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนพัฒนาอาจารย์ มหาวิทยาลัยบูรพา