

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยตู้อบไฟฟ้า (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

- 1) ภาชนะปิดความชื้น (Moisture can)
- 2) โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3) คีมคีบ (Tongs)
- 4) ช้อนตักสาร (Spatula)

เครื่องมือ

- 1) ตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้า (Hot air oven)
- 2) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)

วิธีการ

- 1) อบภาชนะปิดความชื้นพร้อมฝา ที่ตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 30 นาที ชั่งน้ำหนัก (W_1)
- 2) ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1 กรัม ใส่ในภาชนะปิดความชื้นที่อบเรียบร้อยแล้ว และชั่งน้ำหนัก (W_2)
- 3) นำภาชนะปิดความชื้นพร้อมฝาไปอบในตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเปิดฝาทิ้งไว้
- 4) นำภาชนะปิดความชื้นออกจากตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้า โดยปิดฝาทันที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 30 นาที ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
- 5) นำไปอบต่ออีก 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักที่คงที่ (ผลต่างของการชั่งสองครั้งติดกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม) (W_3)

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(W_2 - W_3)}{(W_2 - W_1)} \times 100$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของกระป๋องอบความชื้น (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของกระป๋องอบความชื้นและตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_3 = น้ำหนักของกระป๋องอบความชื้นและตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

2. วิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

- 1) ชุดสกัดไขมัน (Soxtec Extractor รุ่น 2050)
- 2) กระดาษกรองเบอร์ 4
- 3) ช้อนตักสาร (Spatula)
- 4) โถดูดความชื้น (Desiccator)

เครื่องมือ

- 1) เครื่องสกัดไขมัน (Soxtec Aventi รุ่น 2050)
- 2) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 3) ตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้า (Hot air oven)
- 4) ตู้ดูดควัน (Fume hood)

สารเคมี

ปิโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether, RCI Labscan, Thailand)

วิธีวิเคราะห์

- 1) ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม (W_1) ใส่ในกระดาษกรองเบอร์ 4 พับกระดาษกรองให้เล็กเพื่อให้ใส่ในทิมเบอร์ ชั่งน้ำหนักกระป๋องรองรับไขมัน (W_2)
- 2) เปิดเครื่องสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดเครื่องทำความเย็น
- 3) จากนั้นนำชุดสกัดไขมัน (Soxtec Extractor รุ่น 2050) เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ตัวอย่างละ 80 มิลลิลิตร
- 4) กดปุ่ม start เพื่อให้เครื่องเริ่มทำงาน เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง
- 5) จากนั้นนำกระป๋องรองรับไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 30 นาที และบันทึกน้ำหนัก (W_3)

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{(W_3 - W_2)}{W_1} \times 100$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_2 = น้ำหนักกระป๋องรองรับไขมัน (กรัม)

W_3 = น้ำหนักกระป๋องรองรับไขมันที่มีไขมัน (กรัม)

3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

- 1) ขวดเคลดาล์สำหรับย่อยตัวอย่าง (Kjeldahl flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2) ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3) บิวเรต (Burette) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 4) กระบอกตวง (Measuring cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 5) ขวดน้ำกลั่น
- 6) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

เครื่องมือ

- 1) ชุดย่อยโปรตีน (Digestion unit)
- 2) ชุดกลั่นโปรตีน (Distillation apparatus)
- 3) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 4) ตู้ดูดควัน (Fume hood)

สารเคมี

- 1) Sulfuric acid (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 98 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 2) คะตะลิตส์หาโปรตีน
- 3) Sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 4) Sulfuric acid (H_2SO_4) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
- 5) อินดิเคเตอร์ผสม ประกอบด้วย Methyl red ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในแอลกอฮอล์ ผสมกับ Bromocresol green ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:1
- 6) กรดบอริก (Boric acid) ความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

วิธีวิเคราะห์

- 1) ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม (W_1) ถ่ายตัวอย่างลงในหลอดย่อยโปรตีน ทำ Blank ควบคู่ไปด้วย เติมน้ำกลั่น 2 เม็ด
- 2) เติมน้ำ Sulfuric acid (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 98 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 20 มิลลิลิตร โดยเอียงหลอดย่อยโปรตีน และค่อยๆรินกรดลงข้างๆหลอด เพื่อล้างตัวอย่างที่อาจติดอยู่ข้างหลอดให้หมด และค่อยๆเขย่าเบาๆ
- 3) นำไปย่อยที่ชุดย่อยโปรตีน โดยใช้เวลาย่อยประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสารละลายใส จึงปิดชุดย่อยและรอจนกระทั่งสารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 4) นำสารละลายที่ได้ต่อกับเครื่องกลั่นโปรตีน โดยนำขวดรูปชมพู่ที่มีกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 50 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ผสมลงไป 2-3 หยด
- 5) เติมน้ำ Sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้มากเกินพอ (ประมาณ 70-90 มิลลิลิตร) ข้อสังเกต ถ้าปริมาณค่ามากเกินไป สารละลายจะมีสีดำ ถ้ายังไม่เกิดสีดำ ให้เติมน้ำ Sodium hydroxide (NaOH) เพิ่มอีก 5-10 มิลลิลิตร
- 6) เปิดเครื่องเริ่มทำการกลั่น โดยให้ทำ Blank ก่อนตัวอย่าง
- 7) นำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน Sulfuric acid (H_2SO_4) จนได้จุดยุติ คือ สังเกตสีชมพูปรากฏขึ้น และสารละลายสีเทอม่วงจางหายไป

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{(V_a - V_b) \times H_2SO_4 \times 1.4007}{W}$$

เมื่อ V_a = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_b = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 ที่ใช้ในการไทเทรต Blank (มิลลิลิตร)

H_2SO_4 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) = ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ) x แฟกเตอร์

โดยค่าแฟกเตอร์ของเจลาตินจากปลา มีค่าเท่ากับ 5.4

4. วิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

- 1) ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (Crucible)
- 2) ช้อนตักสาร (Spatula)
- 3) คีมคีบ (Tongs)
- 4) โถดูดความชื้น (Desiccator)

เครื่องมือ

- 1) เตาเผาไฟฟ้า (Muffle furnace)
- 2) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 3) ตู้ดูดควัน (Fume hood)
- 4) เตาไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้ (Heating mantle)

วิธีวิเคราะห์

- 1) เเผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 525-550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก (W_1)
- 2) ชั่งตัวอย่าง 2 กรัมใส่ถ้วยกระเบื้องเคลือบ และชั่งน้ำหนัก (W_2)
- 3) นำถ้วยกระเบื้องเคลือบไปเผาบนเตาไฟฟ้า โดยเพิ่มความร้อนขึ้นทีละน้อย จนตัวอย่างไหม้เกรียม และเผาจนหมดควัน
- 4) นำถ้วยกระเบื้องเคลือบไปเผาต่อในเตาเผาไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 525-550 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาว นำถ้วยกระเบื้องเคลือบออกจากเตาเผา ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น และได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักคงที่ หมายถึง ผลต่างของการชั่งสองครั้งติดกันมีค่าไม่เกิน 2 มิลลิกรัม) น้ำหนักที่ชั่งได้ (W_3)

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้าทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{(W_3 - W_1)}{(W_2 - W_1)} \times 100$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่าง (กรัม)

W_3 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบและเถ้า (กรัม)

5. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry (Waterborg, 2002)

สารเคมี

- 1) Sodium carbonate (Na_2CO_3) เข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 2) Cupric sulfate, 5-hydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 3) Sodium potassium tartate เข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 4) NaOH เข้มข้น 2 นอร์มอล
- 5) Folin reagent
- 6) สารมาตรฐาน โปรตีน (Bovine serum albumin, BSA)
- 7) น้ำกลั่น

เตรียมสารละลายผสม complex-forming reagent

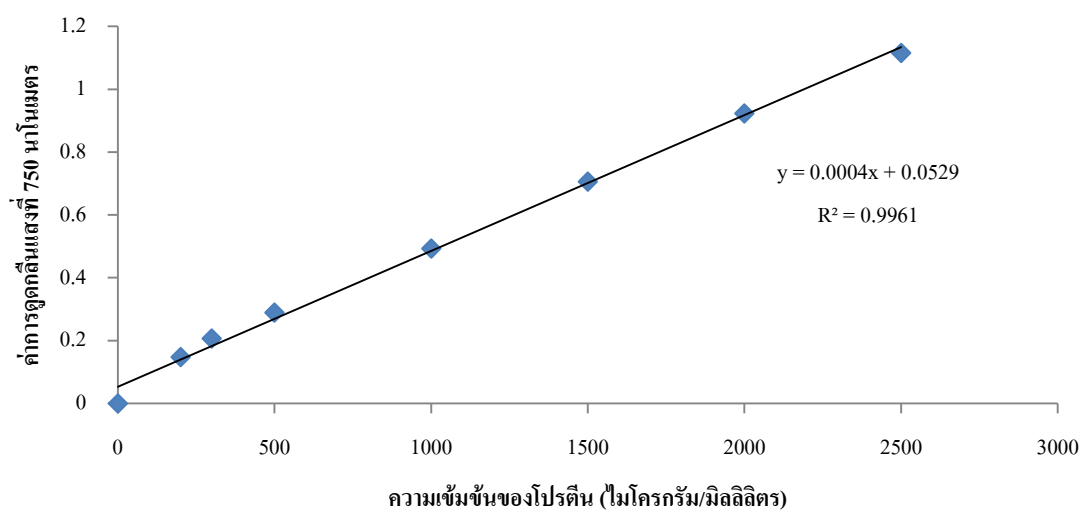
ผสมสารละลาย Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ Sodium potassium tartate เข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 100:1:1 และวางทิ้งไว้

วิธีวิเคราะห์

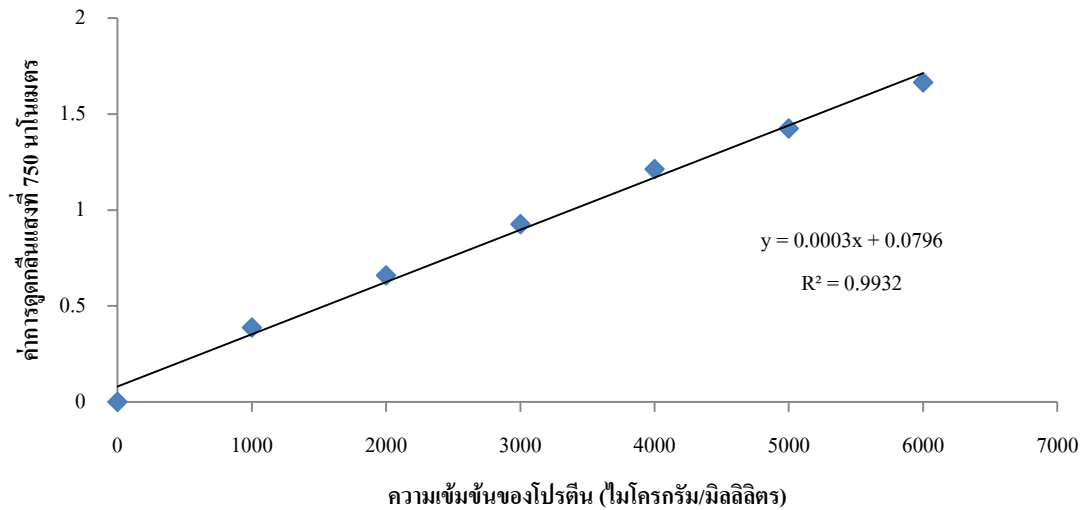
- 1) เตรียมสารมาตรฐาน โปรตีน (BSA) เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน ดังตารางที่ ก-1 หรือตัวอย่างที่ต้องการจะวิเคราะห์ลงในหลอดทดลอง ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และเติม NaOH ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 2) นำหลอดทดลองออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิและวางทิ้งไว้จนเย็น เตรียมสารละลายผสม complex-forming reagent ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 3) เตรียมสารละลาย Folin reagent ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร
- 4) คำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ก-1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ในการทดสอบโปรตีน ด้วยวิธี Lowry

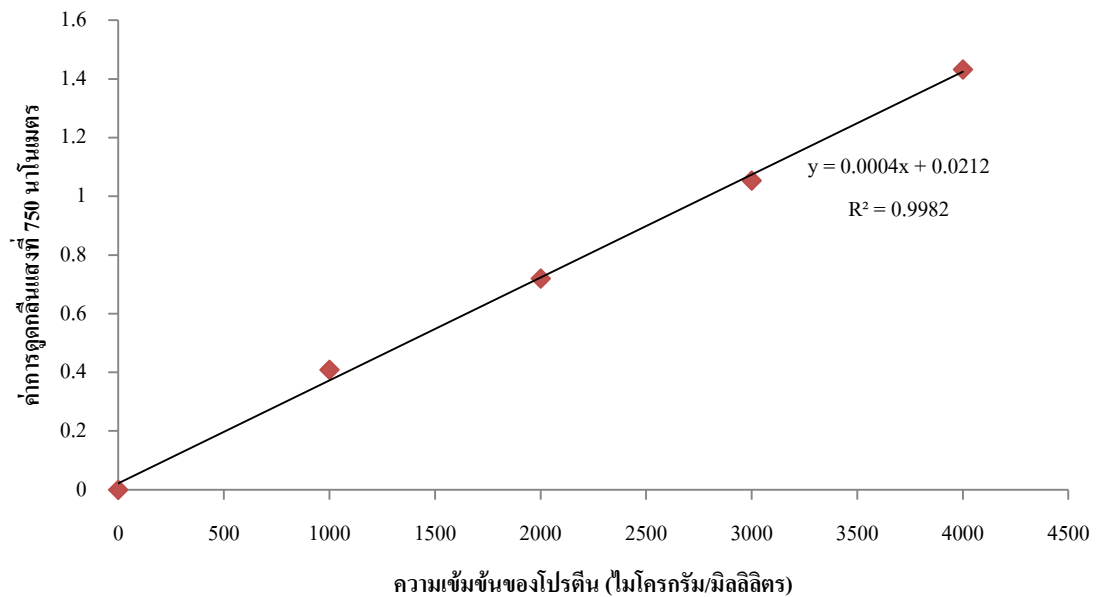
หลอดที่	น้ำกลั่น (ไมโครกรัม)	BSA (ไมโครกรัม)	ความเข้มข้นของ BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	500	0	0
2	488	12.5	50
3	475	25	100
4	450	50	200
5	375	125	500
6	250	250	1500
7	0	500	2000



ภาพที่ ก-1 กราฟมาตรฐานของการหาโปรตีน โดยวิธี Lowry เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากหนึ่งปลาบึก สำหรับการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟก่อนการสกัด



ภาพที่ ก-2 กราฟมาตรฐานของการหาโปรตีน โดยวิธี Lowry เพื่อคำนวณปริมาณ โปรตีนที่สกัดได้จากหนังปลาบึก สำหรับการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟร่วมกับอัลตราซาวด์ก่อนการสกัด



ภาพที่ ก-3 กราฟมาตรฐานของการหาโปรตีน โดยวิธี Lowry เพื่อคำนวณปริมาณ โปรตีนสำหรับการตกตะกอนเจลาติน

6. การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE (ดัดแปลงจาก Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

ชุดอิเล็กโตรฟีสิสแบบมินิเจล

สารเคมีและการเตรียม

- 1) Acrylamide/bis- acrylamide: ละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ bis- acrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
- 2) สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 3) สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 4) สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 5 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 5) TEMED
- 6) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8
- 7) สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8
- 8) Sample buffer (non-reducing buffer) ประกอบด้วย:

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น	0.5	โมลาร์ pH 6.8
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.4	กรัม
กลีเซอรอล	2	มิลลิลิตร
โบรโมฟินอลบลู	0.005	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ให้ได้ 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

- 9) Running buffer ประกอบด้วย:

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	25	มิลลิโมลาร์
ไกลซีน	200	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.5	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

- 10) โปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ เจลาตินจากหมู (MP Biomedicals, LLC, France) และเจลาตินจากกระดูกวัว (Wako Pure Chemical Industries, Japan)
- 11) สีย้อมโปรตีน Coomassie Brilliant Blue R-250

12) Staining solution ประกอบด้วย:

Coomassie Brilliant Blue R-250	เข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
เมทานอล	เข้มข้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
กรดอะซิติก	เข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

13) Destaining solution I: ผสมเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ กรดอะซิติก เข้มข้นร้อยละ 7.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

14) Destaining solution II: ผสมเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ กรดอะซิติก เข้มข้นร้อยละ 7.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

วิธีการ

1) การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเจลาติน หรือโปรตีนมาตรฐาน 0.2 กรัม มาละลายในสารละลาย โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5,000g นาน 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน ด้วยวิธี Lowry (Waterborg, 2002) ให้ได้ประมาณ 4 มิลลิกรัม นำส่วนใสมาผสม กับ sample buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นนำสารละลายผสมต้มในน้ำเดือด นาน 3 นาที

2) การเตรียม Running gel (7.5% gel) 10 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	4.7	มิลลิลิตร
30% Acrylamide/0.8% bis-acrylamide (น้ำหนักต่อปริมาตร)	2.5	มิลลิลิตร
Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.8	2.6	มิลลิลิตร
10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) SDS	100	ไมโครลิตร
10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) Ammonium persulfate	100	ไมโครลิตร
เขย่าให้เข้ากัน		
TEMED	10	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูใส่กระจกสำหรับเตรียมแผ่นเจล

3) การเตรียม Stacking gel (4% gel) 10 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	3	มิลลิลิตร
30% Acrylamide/0.8% bis-acrylamide (น้ำหนักต่อปริมาตร)	0.665	มิลลิลิตร
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.250	มิลลิลิตร
10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) SDS	50	ไมโครลิตร
10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) Ammonium persulfate	25	ไมโครลิตร
เขย่าให้เข้ากัน		
TEMED	3	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูดใส่กระบอกสำหรับเตรียมแผ่นเจลจนเต็ม

4) การแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นเติม Running buffer ให้เต็ม chamber ด้านใน แล้วโหลดตัวอย่างที่เตรียมไว้ จากข้อ 1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ก่อนเติม Running buffer ให้เต็ม chamber ด้านนอก ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้ากับ power supplier เปิดกระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมป์ (สำหรับเจล 2 แผ่น) รอจนสีของโบรมอฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาถึงเกือบสุดปลายกระบอกจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า

5) การย้อมสีโปรตีนในเจล

นำเจลมาย้อมสี โดยแช่ใน Staining solution นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ใน Destaining solution I นาน 15 นาที แล้วนำมาแช่ทิ้งไว้ข้ามคืนใน Destaining solution II

7. การคำนวณปริมาณร้อยละการตกตะกอนโปรตีน (Bourtoom *et al.*, 2009)

$$\text{ร้อยละการตกตะกอนโปรตีน} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลาย (มิลลิกรัม)} - \text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายใส (มิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลาย (มิลลิกรัม)}} \times 100$$

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

1. การวัดสมบัติการเปลี่ยนแปลงทางความร้อนของเจลาตินผง (ตัดแปลจาก Sai-Ut, Jongjareonrak, and Rawdkuen, 2012)

วัดสมบัติการเปลี่ยนแปลงทางความร้อนโดยอ้างอิงตามวิธีการใช้งานของเครื่อง Perkin Elmer Differential Scanning Calorimetry ทำการ Calibrate โดยใช้อินเดียมเทอร์โมแกรม (Indium thermogram) จากนั้นบรรจุตัวอย่างเจลาติน น้ำหนัก 12 มิลลิกรัม ในอะลูมิเนียมแพน (aluminum pan) ปิดฉนวนให้สนิท และนำไปตรวจสอบในช่วงอุณหภูมิ 10-120 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนที่ 20 องศาเซลเซียส และใช้ถาดเปล่าเป็นถาดอ้างอิง การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูงสุดตรวจสอบได้จากพีคการดูดความร้อน และการเปลี่ยนแปลงของเอนทัลปี สามารถคำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟของพีคการดูดความร้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ตารางผลการทดลอง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ก-1 ร้อยละเจลาตินที่สกัดได้จากหนังปลาบึกที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟก่อนการสกัดที่ระดับกำลังและเวลาต่างๆ

ไมโครเวฟ		เวลาในการสกัด (h)										
กำลัง(W)	เวลา(s)	0	0.5	1	1.5	2	3	4	6	8	10	12
300	ชุดควบคุม	0.03 ± 0.01	1.82 ± 0.03	2.50 ± 0.04	3.02 ± 0.07	3.69 ± 0.02	4.10 ± 0.03	4.42 ± 0.04	4.69 ± 0.01	5.02 ± 0.02	5.24 ± 0.03	5.50 ± 0.04
	30	2.34 ± 0.06	4.36 ± 0.01	5.10 ± 0.04	5.72 ± 0.03	6.17 ± 0.05	6.50 ± 0.06	6.77 ± 0.06	7.33 ± 0.04	7.48 ± 0.04	7.73 ± 0.05	8.27 ± 0.05
	60	2.80 ± 0.03	5.52 ± 0.02	5.74 ± 0.04	6.69 ± 0.05	6.73 ± 0.03	7.45 ± 0.07	7.82 ± 0.07	8.15 ± 0.06	8.43 ± 0.07	8.57 ± 0.04	8.73 ± 0.06
	90	2.80 ± 0.02	4.46 ± 0.04	4.63 ± 0.05	5.22 ± 0.03	5.44 ± 0.03	6.05 ± 0.06	6.53 ± 0.06	7.63 ± 0.05	8.26 ± 0.04	8.53 ± 0.06	8.98 ± 0.07
	120	2.51 ± 0.04	4.01 ± 0.04	4.60 ± 0.04	4.99 ± 0.07	5.40 ± 0.04	6.11 ± 0.02	6.47 ± 0.06	7.61 ± 0.04	8.14 ± 0.04	8.64 ± 0.04	9.14 ± 0.03
	30	1.80 ± 0.05	3.37 ± 0.02	4.27 ± 0.02	5.06 ± 0.06	5.47 ± 0.05	6.19 ± 0.05	6.44 ± 0.05	6.96 ± 0.08	7.19 ± 0.07	7.70 ± 0.06	8.44 ± 0.02
	60	4.80 ± 0.08	6.18 ± 0.03	6.83 ± 0.04	7.21 ± 0.09	7.45 ± 0.06	7.72 ± 0.06	7.83 ± 0.04	8.27 ± 0.08	9.02 ± 0.05	9.27 ± 0.06	9.61 ± 0.09
	90	4.63 ± 0.01	6.42 ± 0.06	6.96 ± 0.08	7.44 ± 0.06	7.48 ± 0.09	7.51 ± 0.10	8.10 ± 0.05	8.44 ± 0.05	9.36 ± 0.04	9.46 ± 0.05	10.24 ± 0.08
	120	3.62 ± 0.03	6.27 ± 0.04	6.79 ± 0.05	7.22 ± 0.08	7.43 ± 0.05	7.84 ± 0.08	8.15 ± 0.03	9.35 ± 0.08	9.48 ± 0.08	9.78 ± 0.04	10.35 ± 0.07
	30	1.76 ± 0.06	3.71 ± 0.01	4.27 ± 0.08	5.23 ± 0.08	5.71 ± 0.05	6.11 ± 0.10	6.43 ± 0.05	7.04 ± 0.05	7.32 ± 0.07	7.68 ± 0.08	8.13 ± 0.09
	60	4.14 ± 0.04	6.90 ± 0.05	7.50 ± 0.04	7.78 ± 0.04	8.31 ± 0.02	8.60 ± 0.01	8.76 ± 0.03	9.28 ± 0.05	9.37 ± 0.08	9.50 ± 0.05	9.80 ± 0.07
	90	4.88 ± 0.03	7.27 ± 0.04	7.87 ± 0.05	8.12 ± 0.07	8.40 ± 0.07	8.67 ± 0.02	8.88 ± 0.04	9.33 ± 0.04	9.47 ± 0.06	9.88 ± 0.08	10.09 ± 0.04
600	120	4.96 ± 0.05	7.73 ± 0.04	8.38 ± 0.08	9.36 ± 0.03	9.46 ± 0.02	9.63 ± 0.03	10.11 ± 0.04	10.35 ± 0.04	10.34 ± 0.06	10.44 ± 0.07	10.49 ± 0.05

หมายเหตุ: แสดงข้อมูลในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ ค-2 ร้อยละการตกตะกอนของเจลาตินจากหนังปลาน้ำจืดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเอทานอล	ร้อยละการตกตะกอนของเจลาตินจากหนังปลาน้ำจืด
0	4.52 ± 0.29^f
10	5.77 ± 0.29^f
20	18.53 ± 1.49^d
30	15.53 ± 1.83^c
40	24.16 ± 1.44^c
50	91.33 ± 1.50^b
60	95.85 ± 0.28^a
70	95.79 ± 0.38^a
80	94.81 ± 0.26^a

หมายเหตุ: แสดงข้อมูลในรูป ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ ค-3 ตารางบันทึกน้ำหนักของเม็ดเจลอัลจินต ขนาดของตะแกรงคัดขนาดและถาด

i	Mesh number	D_{pi} (มิลลิเมตร)	มวลของ ตะแกรงเปล่า (กรัม)	มวลของตะแกรง และอนุภาค (กรัม)	m_i (กรัม)	x_i	x_i'	$\bar{D}_{pi}$ (มิลลิเมตร)	$x_i \bar{D}_{pi}$
4	8	2.38	553.37	553.37	0	-	1	-	-
3	12	1.68	503.28	503.61	0.33	0.041	0.959	0.706	0.029
2	18	1.00	493.18	499.17	5.99	0.747	0.212	0.595	0.445
1	30	0.595	483.07	484.77	1.70	0.212	-	0.595	0.126
0	pan	-	377.71	377.71	0	-	-	-	-
เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยโดยมวล เท่ากับ 0.600 มิลลิเมตร									

D_{pi} คือ ขนาดรูเปิดของตะแกรงลำดับที่ i ซึ่งเป็นตะแกรงที่อนุภาคล้างอยู่ (มิลลิเมตร)

m_i คือ มวลของอนุภาคที่ค้างในตะแกรงลำดับที่ i (กรัม)

x_i คือ อัตราส่วนโดยมวลของอนุภาคในตะแกรงลำดับที่ i

x_i' คือ ผลรวมของอัตราส่วนโดยมวลของอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า D_{pi}

$\bar{D}_{pi}$ คือ ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคที่ค้างในตะแกรงลำดับที่ i (มิลลิเมตร)

ตารางที่ ค-4 ตารางบันทึกน้ำหนักของเม็ดเจลเจลาตินจากหนังปลาบึกร่วมกับอัลจินตที่ pH 4 และขนาดของตะแกรงคัดขนาดและภาค

i	Mesh number	D_{pi} (มิลลิเมตร)	มวลของ ตะแกรงเปล่า (กรัม)	มวลของตะแกรง และอนุภาค (กรัม)	m_i (กรัม)	x_i	x_i'	$\bar{D}_{pi}$ (มิลลิเมตร)	$x_i \bar{D}_{pi}$
4	8	2.38	553.37	553.37	0	-	1	-	-
3	12	1.68	503.37	504.24	0.87	0.109	0.891	0.706	0.077
2	18	1.00	493.12	499.2	6.08	0.762	0.129	0.595	0.454
1	30	0.595	483.10	484.13	1.03	0.129	-	0.595	0.077
0	pan	-	377.51	377.51	0	-	-	-	-
เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยโดยมวล เท่ากับ 0.608 มิลลิเมตร									

D_{pi} คือ ขนาดรูเปิดของตะแกรงลำดับที่ i ซึ่งเป็นตะแกรงที่อนุภาคล้างอยู่ (มิลลิเมตร)

m_i คือ มวลของอนุภาคที่ค้างในตะแกรงลำดับที่ i (กรัม)

x_i คือ อัตราส่วนโดยมวลของอนุภาคในตะแกรงลำดับที่ i

x_i' คือ ผลรวมของอัตราส่วนโดยมวลของอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า D_{pi}

$\bar{D}_{pi}$ คือ ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคที่ค้างในตะแกรงลำดับที่ i (มิลลิเมตร)

ตารางที่ ค-5 ตารางบันทึกน้ำหนักของเม็ดเจลเจลาตินจากหนังปลาบึกร่วมกับอัลจินตที่ pH 10.5 และขนาดของตะแกรงคัดขนาดและถาด

i	Mesh number	D_{pi} (มิลลิเมตร)	มวลของ ตะแกรงเปล่า (กรัม)	มวลของตะแกรง และอนุภาค (กรัม)	m_i (กรัม)	x_i	x_i'	$\bar{D}_{pi}$ (มิลลิเมตร)	$x_i \bar{D}_{pi}$
4	8	2.38	553.37	553.37	0	-	1	-	-
3	12	1.68	503.32	503.38	0.06	0.009	0.991	0.706	0.007
2	18	1.00	493.2	499.08	5.88	0.923	0.068	0.595	0.549
1	30	0.595	483.14	483.57	0.43	0.068	-	0.595	0.040
0	pan	-	377.71	377.71	0	-	-	-	-
เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยโดยมวล เท่ากับ 0.596 มิลลิเมตร									

D_{pi} คือ ขนาดรูเปิดของตะแกรงลำดับที่ i ซึ่งเป็นตะแกรงที่อนุภาคล้างอยู่ (มิลลิเมตร)

m_i คือ มวลของอนุภาคที่ค้างในตะแกรงลำดับที่ i (กรัม)

x_i คือ อัตราส่วนโดยมวลของอนุภาคในตะแกรงลำดับที่ i

x_i' คือ ผลรวมของอัตราส่วนโดยมวลของอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า D_{pi}

$\bar{D}_{pi}$ คือ ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคที่ค้างในตะแกรงลำดับที่ i (มิลลิเมตร)

ตารางที่ ค-6 ความสามารถในการขยายตัวของตัวภายหลังการดูดซับน้ำที่เวลาต่างๆ ของเม็ดเจลเจลาตินจากหนังปลาบึกร่วมกับอัลจิเนต

เวลา (นาที่)	ความสามารถในการขยายตัวของตัวภายหลังการดูดซับน้ำของเม็ดบีด		
	อัลจิเนต	เจลาตินจากหนังปลาบึกร่วมกับอัลจิเนต	
		pH 4.0	pH 10.5
0	0	0	0
30	0.4233 ± 0.001	0.8837 ± 0.016	1.0282 ± 0.010
60	0.4098 ± 0.008	1.0044 ± 0.012	1.1593 ± 0.028
90	0.4534 ± 0.002	1.0153 ± 0.026	1.3150 ± 0.006
120	0.4890 ± 0.008	1.1574 ± 0.021	1.3723 ± 0.028
150	0.4525 ± 0.011	1.1348 ± 0.024	1.3814 ± 0.024
180	0.4805 ± 0.009	1.1590 ± 0.018	1.4229 ± 0.019
210	0.4221 ± 0.034	1.0681 ± 0.027	1.3229 ± 0.002
240	0.4347 ± 0.022	1.1543 ± 0.022	1.3195 ± 0.005
270	0.4573 ± 0.018	1.0722 ± 0.019	1.4747 ± 0.030
300	0.4640 ± 0.010	1.1489 ± 0.011	1.3382 ± 0.035
480	0.4670 ± 0.012	1.1324 ± 0.022	1.3525 ± 0.027
600	0.4914 ± 0.009	1.1527 ± 0.008	1.3683 ± 0.023
720	0.4634 ± 0.014	1.1307 ± 0.015	1.4141 ± 0.029
1440	0.4759 ± 0.022	1.1303 ± 0.012	1.3783 ± 0.038

หมายเหตุ: แสดงข้อมูลในรูป ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ ค-7 ความสามารถในการขยายตัวของตัวภายหลังการดูดซับน้ำของเม็ดเจลเจลาตินจากหนังปลาบึก ร่วมกับอัลจินตที่ pH 10.5 ณ เวลาต่างๆ ซึ่งหยดในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

เวลา (นาที)	ความสามารถในการขยายตัวของตัวภายหลังการดูดซับน้ำของเม็ดเจล		
	0.5% CaCl ₂	1% CaCl ₂	1.5% CaCl ₂
0	0	0	0
30	1.61 ± 0.031	1.05 ± 0.010	1.03 ± 0.009
60	1.91 ± 0.017	1.33 ± 0.033	1.16 ± 0.007
90	1.99 ± 0.021	1.51 ± 0.006	1.32 ± 0.009
120	2.15 ± 0.021	1.52 ± 0.031	1.37 ± 0.012
150	2.24 ± 0.026	1.58 ± 0.024	1.38 ± 0.038
180	2.37 ± 0.017	1.58 ± 0.019	1.34 ± 0.032
210	2.30 ± 0.025	1.58 ± 0.002	1.32 ± 0.015
240	2.29 ± 0.009	1.63 ± 0.015	1.32 ± 0.019
270	2.33 ± 0.022	1.56 ± 0.014	1.37 ± 0.018
300	2.30 ± 0.011	1.57 ± 0.016	1.38 ± 0.006
330	2.33 ± 0.016	1.58 ± 0.027	1.42 ± 0.027
360	2.33 ± 0.022	1.62 ± 0.018	1.45 ± 0.012
480	2.33 ± 0.007	1.65 ± 0.029	1.49 ± 0.001

หมายเหตุ: แสดงข้อมูลในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

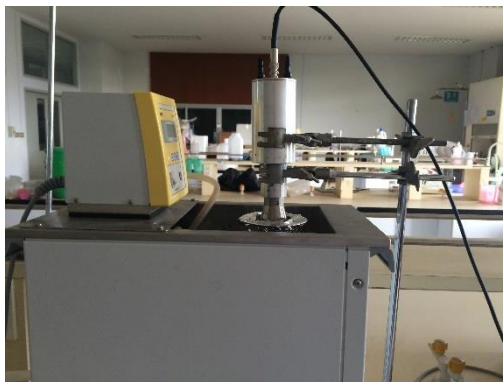
รูปภาพ



ภาพที่ ง-1 หนังปลาบึกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและกรด



ภาพที่ ง-2 หนังปลาบึกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟกำลัง 600 วัตต์ นาน 120 วินาที



ภาพที่ ง-3 การปรับสภาพหนังปลาบึกด้วยอัลตราซาวด์



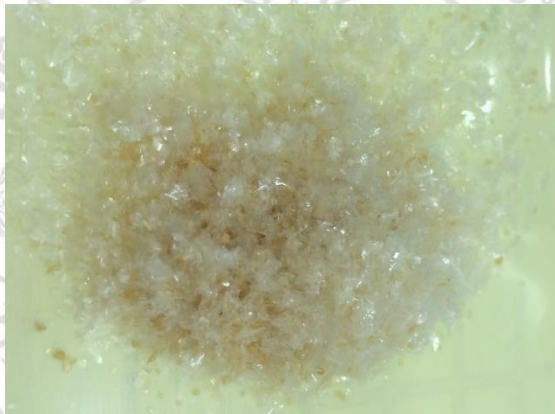
ภาพที่ ง-4 การสกัดเจลาติน



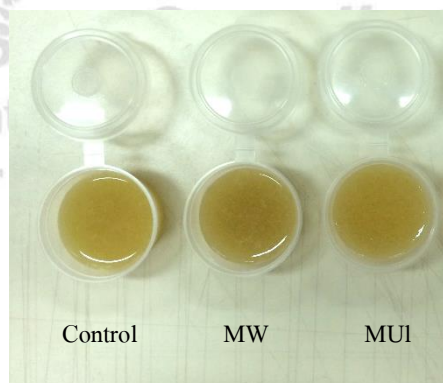
ภาพที่ ง-5 หนังปลาบึกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟและอัลตราซาวด์หลังจากสกัดเจลาติน



ภาพที่ ง-6 การอบแห้งเจลาติน

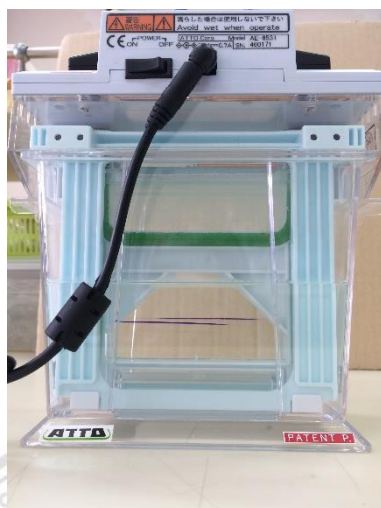


ภาพที่ ง-7 เจลาตินผง



ภาพที่ ง-8 เจลของเจลาติน

- เมื่อ
- Control คือ เจลาตินจากหนังปลาบึกที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ
 - MW คือ เจลาตินจากหนังปลาบึกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟ
 - MU คือ เจลาตินจากหนังปลาบึกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟร่วมกับอัลตราซาวด์



ภาพที่ ง-9 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE



ภาพที่ ง-10 เม็ดเจลเจลาตินจากหนังปลาบีกว่ร่กับอัลจินตที่ pH 4



ภาพที่ ง-11 เม็ดเจลเจลาตินจากหนังปลาบีกว่ร่กับอัลจินตที่ pH 10.5



ภาพที่ ง-12 เม็ดเจลอัลจิเนตหลังการอบแห้ง



ภาพที่ ง-13 เม็ดเจลเจลาตินจากหนังปลาบึกร่วมกับอัลจิเนตที่ pH 4 หลังการอบแห้ง



ภาพที่ ง-14 เม็ดเจลเจลาตินจากหนังปลาบึกร่วมกับอัลจิเนตที่ pH 10.5 หลังการอบแห้ง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาววรรณฮัสนี เจ๊ะอุบง

วัน เดือน ปีเกิด 8 ตุลาคม 2533

สถานที่เกิด จังหวัดนราธิวาส

ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2556 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปีการศึกษา 2552 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย
โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดปัตตานี



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved