

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

หนังปลาบึกที่ใช้ในการศึกษาซื้อจากตลาดแม่ทองคำ ตำบลแม่คำ อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ซึ่งได้จากปลาบึกที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 18-20 กิโลกรัม นำหนังปลาบึกที่ซื้อจากตลาดใส่ในกล่องบรรจุ น้ำแข็งในอัตราส่วนของหนังปลาต่อน้ำแข็ง 1:2 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) จากนั้นขนส่งมายัง คณะอุตสาหกรรมเกษตร จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้เวลาในการขนส่งประมาณ 3 ชั่วโมง นำหนังปลาบึก ที่ได้มาล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นขูดส่วนเนื้อและไขมันที่ติดออกและล้างให้สะอาด ตัดให้มีขนาด ประมาณ 1.0×1.0 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.1) และบรรจุในถุงไนล่อนใส ขนาด 150 x 230 มิลลิเมตร บรรจุ 100 กรัมต่อถุง ปิดผนึกถุงด้วยความร้อนและนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาศึกษา



ภาพที่ 3.1 หนังปลาบึกที่ผ่านการทำความสะอาดและตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

3.2 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, RCI Labscan, Thailand)
2. กรดอะซิติก (Acetic acid, RCI Labscan, Thailand)
3. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartate, RCI Labscan, Thailand)
4. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Ajax Finechem, New Zealand)

5. คอปเปอร์ซัลเฟต (Cupric sulfate, 5-hydrate, Sigma-Aldrich, USA)
6. โฟลิน-ไซโอแคลทิว ฟีนอล รีเอเจน (Folin- ciocalteu phenol reagent, Merck, Germany)
7. สารมาตรฐานโปรตีน (Bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich, USA)
8. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate (SDS), Merck, Germany)
9. ทริสมาเบส (Trizma® base, Riedel-de Haën®, Germany)
10. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, RCI Labscan, Thailand)
11. กลีเซอรอล (Glycerol, Fisher Scientific, India)
12. โบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue, USB Corporation, USA)
13. อะคริลามิด (Acrylamide, Sigma-Aldrich, USA)
14. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulphate, Ajax Finechem, New Zealand)
15. เตตราเมทิล อีทิลีน ไดเอมีน (N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine (TEMED), Sigma-Aldrich, USA)
16. ไกลซีน (Glycine, Fluka Biochemika, Switzerland)
17. โคมัสซิบริลเลียนบลู (Coomassie brilliant blue R-250, Merck, Germany)
18. เมทานอล (Methanol, RCI Labscan, Thailand)
19. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, RCI Labscan, Thailand)
20. น้ำกลั่น (Distilled water, Union Science, Thailand)
21. เอทานอล เข้มข้นร้อยละ 95 (Ethanol, AT Science, Thailand)
22. โซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate, Union Science, Thailand)
23. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride, Yok Intertrade, Thailand)
24. เจลาตินมาตรฐานจากหนังหมู (MP Biomedicals, LLC, France)
25. เจลาตินมาตรฐานจากหนังวัว (Wako Pure Chemical Industries, Japan)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Drawell, YP 2002, China)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (OHAUS, Pioneer, PA 214, USA)
3. เครื่องกวนผสม (Overhead stirrer, RW200 Digital, IKA, Germany)
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Microprocessor pH meter, METTLER YOLEDO, LE 438 pH, Switzerland)
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, heating bath B-491, Buchi, Switzerland)

6. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave oven, Samsung Model ME711K, 2450 MHz, Malaysia)
7. เครื่องอัลตราโซนิกแบบโพรบ (Sonics vibra-cell, VC 505; 500 Watt, 20 kHz Ultrasonic Processor, USA)
8. อ่างทำความเย็น (Cooling thermostat; LAUDA Ecoline Staredition RE 212, Germany)
9. เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ ช่วงปริมาตร 20-1000 ไมโครลิตร (Auto pipet, High tech lab, Poland)
10. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Microcentrifuge, Model mini, ScanSpeed, Denmark)
11. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer, VTX-3000L, LMS, Japan)
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, DU 7500, Beckman, USA)
13. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Binder, ED 53, vacuum pump V 700, Germany)
14. เครื่องบดอาหาร (Blender, Moulinex, LM520148, China)
15. โถดูดความชื้น (desiccator)
16. เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Soxtec aventi 2050, Sweden)
17. เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle Furnace, Gallenkamp FSE520, England)
18. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield digital viscometer, Model LVDV-II+, USA)
19. เครื่องโฮโมจีไนส์ (Homogenizer, Model T50 basic, IKA, Germany)
20. เครื่องวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน (Perkin Elmer Differential Scanning Calorimetry, Model Pyris Diamond DSC, USA)
21. เครื่องวัดสี (Konica Minolta CR-410, Japan)
22. เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer, Model TA.XT Plus, Stable Micro System, England)
23. เครื่องเขย่าตะแกรงร่อน (Test sieve shaker, Endercotts Ltd, England)
24. ตะแกรงคัดขนาด (Laboratory test sieve, Endercotts Ltd, England)
25. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร
26. ฟ้าขาวบาง
27. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -18 องศาเซลเซียส (Air circulation condenser, Mitsubishi electric, MF-U14K, Thailand)
28. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope, CHK2-F-GS, Olympus optic, Japan)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาบึก

นำหนังปลาบึกมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ดังต่อไปนี้

- ปริมาณความชื้น โดยใช้ตู้อบลมร้อน (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-1
- ปริมาณไขมัน โดยวิธี Soxtec (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-2
- ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-3
- ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-4

3.4.2 การปรับสภาพหนังปลาบึกก่อนการสกัดเจลาติน

สกัดเจลาตินจากหนังปลาบึกตามวิธีการของ Jongjareonrak *et al.* (2010) โดยดัดแปลงวิธีการเล็กน้อย เริ่มจากการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและสารสีโดยการแช่หนังปลาบึกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พร้อมคนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนผสม (Overhead stirrer, RW200 Digital, IKA, Germany) โดยใช้ความเร็ว 400 ± 5 รอบต่อนาที และเปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 60 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำหนังปลาล้างด้วยน้ำประปาจนกระทั่งน้ำล้างหนังปลามีค่า pH เป็นกลาง ($\text{pH} < 7.5$) และนำหนังปลาที่ผ่านกระบวนการล้างมาแช่ในสารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 0.05 โมลาร์ในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พร้อมคนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนผสมโดยใช้ความเร็ว 300 ± 5 รอบต่อนาที จากนั้นนำหนังปลาบึกมาล้างด้วยน้ำประปาจนกระทั่งน้ำล้างหนังปลาบึกมีค่า pH เป็นกลาง ($\text{pH} < 7.5$)

3.4.3 การศึกษาผลของการปรับสภาพหนังปลาบึกด้วยไมโครเวฟก่อนการสกัดเจลาติน

นำหนังปลาบึกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและกรดแล้ว 100 กรัม ถ่ายลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปผ่านการให้คลื่นไมโครเวฟ (Samsung Model MS 23F301 EAW/ST, Malaysia) เพื่อศึกษาผลของไมโครเวฟต่อปริมาณเจลาตินที่สกัดได้ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Haihua and Jun (2009) โดยใช้คลื่นไมโครเวฟที่ระดับกำลัง 300, 450 และ 600 วัตต์ (W) เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 วินาที จากนั้นนำหนังปลาบึกที่ผ่านการให้คลื่นไมโครเวฟไปสกัดเจลาตินในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วนของหนังปลาต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พร้อมคนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนผสมโดยใช้ความเร็ว 240 ± 5

รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาการสกัดเท่ากับ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 และ 12 ชั่วโมง นำสารละลายตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) และนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Lowry (Waterborg, 2002) แสดงดังภาพผนวก ก-5 และคำนวณปริมาณร้อยละของเจลาตินที่สกัดได้จากหนังสือปลาน้ำจืด ฉบับที่ 2

$$\text{ร้อยละของเจลาตินที่สกัดได้} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ A คือ ปริมาณโปรตีนในสารละลายใสในหน่วยกรัมต่อหนึ่งปลา 100 กรัม
B คือ ปริมาณโปรตีนในหนังสือปลาในหน่วยกรัมต่อหนึ่งปลา 100 กรัม

โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (MRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ ร้อยละ 95 จากนั้นคัดเลือกสภาวะการใช้ไมโครเวฟที่ให้ปริมาณร้อยละเจลาตินที่สกัดได้สูงสุดสำหรับศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.4.4 การศึกษาผลของการปรับสภาพหนังสือปลาน้ำจืดด้วยไมโครเวฟร่วมกับอัลตราซาวด์ก่อนการสกัดเจลาติน

การศึกษาค้นคว้าของการปรับสภาพหนังสือปลาน้ำจืดด้วยไมโครเวฟและอัลตราซาวด์ร่วมกัน ก่อนการสกัดเจลาติน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.* (2013) โดยใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) และวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken เพื่อศึกษา 3 ปัจจัย ที่มีผลต่อปริมาณร้อยละของเจลาตินที่สกัดได้ ได้แก่ แอมพลิจูดที่ใช้ในการปรับสภาพ (ร้อยละ 50-90) ระยะเวลาในการปรับสภาพด้วยอัลตราซาวด์ (5-20 นาที) และระยะเวลาในการสกัดเจลาติน (4-12 ชั่วโมง) โดยแผนการทดลองนี้ศึกษาปัจจัยละ 5 ระดับ และทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ซ้ำ ($\alpha = 1.5$) ซึ่งระดับของแต่ละปัจจัยแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ระดับของปัจจัยในแผนการทดลอง เพื่อศึกษาผลของการปรับสภาพหนังปลาบึกด้วยไมโครเวฟร่วมกับอัลตราซาวด์ก่อนการสกัด ต่อปริมาณร้อยละของเจลาตินที่สกัดได้

ปัจจัย	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
แอมพลิจูด (ร้อยละ)	X_1	40	50	70	90	100
ระยะเวลาปรับสภาพ (นาทีก)	X_2	1.25	5.00	12.50	20.00	23.75
ระยะเวลาสกัด (ชั่วโมง)	X_3	2	4	8	12	14

นำหนังปลาบึกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟสภาวะที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.3 แช่น้ำกลั่นด้วยอัตราส่วนของหนังปลาต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และนำมาผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวด์ กำลัง 500 วัตต์ ความถี่ 20 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ตามที่ออกแบบไว้ในแผนการทดลองซึ่งแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นนำไปสกัดเจลาตินที่อุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส พร้อมคนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนผสม โดยใช้ความเร็ว 240 ± 5 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างตามสภาวะต่างๆ และนำสารละลายตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) และนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ ด้วยวิธี Lowry (Waterborg, 2002) แสดงดังภาคผนวก ก-5 และคำนวณปริมาณร้อยละของเจลาตินที่สกัดได้ ดังสมการที่ 2

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Design Expert Version 6.0.2 โดยนำผลร้อยละเจลาตินที่สกัดได้จากหนังปลาบึกมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์พหุนามกำลังสอง (Quadratic Model) เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้ง 3 ต่อร้อยละเจลาตินที่สกัดได้ ดังสมการที่ 3

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

โดย Y_i คือค่าตอบสนอง, β_0 คือค่าคงที่, β_i , β_{ii} และ β_{ij} คือสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระ X_i และ X_{ij} และบางเทอมอาจจะถูกตัดออกไประหว่างการวิเคราะห์เพื่อให้ได้แบบจำลองที่มีนัยสำคัญ ได้ค่า lack of fit ที่ไม่มีนัยสำคัญ หรือมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) สูง

นำสมการแบบจำลองที่ได้มาคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังปลาบึกและเกณฑ์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสม คือได้ปริมาณร้อยละของเจลาตินที่สกัดได้สูงที่สุด จากนั้นสกัดเจลาตินตามสภาวะที่เหมาะสม 3 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนาย

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองเพื่อศึกษาการปรับสภาพหนังปลาบึกด้วยไมโครเวฟร่วมกับอัลตราซาวด์ ก่อนการสกัดเจลาติน

สิ่งทดลอง	แอมพลิจูด (ร้อยละ)	ระยะเวลาปรับสภาพ (นาที)	ระยะเวลาสกัด (ชั่วโมง)
1	70	12.50	8
2	70	12.50	8
3	50	5.00	12
4	90	20.00	4
5	50	20.00	12
6	70	12.50	8
7	50	20.00	4
8	70	12.50	2
9	90	20.00	12
10	70	12.50	8
11	100	12.50	8
12	90	5.00	12
13	40	12.50	8
14	90	5.00	4
15	70	1.25	8
16	70	12.50	14
17	50	5.00	4
18	70	12.50	8
19	70	23.75	8
20	70	12.50	8

3.4.5 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี-กายภาพของเจลลิตินจากหนังปลาบึก

สกัดเจลลิตินตามสภาวะที่ได้จากการทดลองที่ 3.4.3 และ 3.4.4 (ภาพที่ 3.2) และนำเจลลิตินที่ได้ไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมี-กายภาพต่างๆ



ภาพที่ 3.2 แสดงกระบวนการสกัดเจลลิตินจากหนังปลาบึกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟ ก่อนการสกัด และผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟร่วมกับอัลตราซาวด์ก่อนการสกัด

1) การวิเคราะห์ทางเคมี

- องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-1 ปริมาณไขมัน โดยวิธี Soxhlet (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-2 ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-3 และปริมาณเถ้า (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-4
- รูปแบบโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) แสดงดังภาคผนวก ก-6

2) การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่

- ความหนืด

วัดความหนืดของตัวอย่างเจลาคตินโดยอ้างอิงจากวิธีการของ Cho *et al.* (2006) และปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ละลายเจลาคตินผง 2 กรัมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส คนเป็นครั้งคราวจนเจลาคตินละลาย จากนั้นนำสารละลายเจลาคตินไปวัดความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด (Brookfield digital Viscometer) โดยใช้หัวทรงกระบอก S18 ความเร็วในการหมุน 200 รอบต่อนาที และมีค่าร้อยละของทอร์คสูงสุด ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส บันทึกค่าเมื่อความหนืดคงที่ โดยใช้เวลาในการวัดประมาณ 10 วินาที และบันทึกค่าในรูปเซนติพอยต์ (cP)

- สมบัติการเกิดโฟม

วัดสมบัติการเกิดโฟมโดยอ้างอิงตามวิธีการของ Jongjareonrak *et al.* (2010) และปรับเปลี่ยนเล็กน้อย นำสารละลายเจลาคติน ซึ่งเตรียมโดยการละลายเจลาคตินผง 2 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส คนเป็นครั้งคราวจนเจลาคตินละลาย และนำสารละลายเจลาคตินไปโฮโมจิไนซ์ ด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายเจลาคตินที่ผ่านการตีจนขึ้นฟองเหลวในกระบอกตวง และอ่านปริมาตรทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไป 10 วินาที และคำนวณความสามารถในการเกิดโฟม (สมการที่ 4)

$$\text{ความสามารถในการเกิดโฟม (ร้อยละ)} = \frac{A - B}{B} \times 100 \quad (4)$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรสารละลายเจลาคตินหลังการทำโฮโมจิไนเซชัน (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรสารละลายเจลาคตินก่อนการทำโฮโมจิไนเซชัน (มิลลิลิตร)

นำสารละลายเจลาคตินที่บรรจุอยู่ในกระบอกตวงวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และอ่านปริมาตรทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที และคำนวณความเสถียรของโฟม (สมการที่ 5)

$$\text{ความเสถียรของโฟม (ร้อยละ)} = \frac{A - B}{B} \times 100 \quad (5)$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรสารละลายเจลาคตินหลังวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรสารละลายเจลาคตินก่อนวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (มิลลิลิตร)

- ค่า pH
วัดค่า pH ของสารละลายเจลาติน เข้มข้นร้อยละ 6.67 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยเครื่องวัด pH
- การเตรียมเจลาติน
เตรียมเจลาตินตามวิธีการของ British Standard 757: 1975 method (BSI, 1975) และปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ผสมผงเจลาตินกับน้ำกลั่นให้มีเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 6.67 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายให้เข้ากันและวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้เจลาตินดูดซับน้ำ นำสารละลายผสมไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และคนเป็นครั้งคราวจนเจลาตินละลาย จากนั้นนำสารละลายผสมดังกล่าว เทใส่พิมพ์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.8 เซนติเมตร สูง 2.7 เซนติเมตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว
- ความแข็งแรงเจล
วัดความแข็งแรงของเจลเจลาตินตัดแปลงจาก British Standard 757: 1975 method (BSI, 1975) นำเจลาตินที่เตรียมไว้ไปวัดความแข็งแรงของเจลเจลาตินด้วยเครื่อง Texture Analyzer โดยใช้โหลดเซลล์ (Load cell) น้ำหนัก 5 กิโลกรัม ด้วยหัววัดรูปร่างทรงกระบอก P/0.5R ตัวอย่างเจลมีเส้นผ่าศูนย์กลาง เท่ากับ 3.8 เซนติเมตร ความหนา เท่ากับ 2.7 เซนติเมตร โดยอ่านค่าแรงสูงสุดที่ได้ (ในหน่วยกรัม) เมื่อกดตัวอย่างเป็นระยะทาง 4 มิลลิเมตร ด้วยความเร็ว 2 มิลลิเมตร/วินาที และ trigger force เท่ากับ 5 กรัม
- สีของเจล
นำตัวอย่างเจลที่เตรียมไว้ไปวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (Minolta Color meter) ด้วยระบบ CIE และรายงานผลในรูป L^* , a^* และ b^*
- สมบัติทางความร้อน
นำเจลาตินผงไปวัดสมบัติการเปลี่ยนแปลงทางความร้อนโดยอ้างอิงตามวิธีการใช้งานของเครื่อง Perkin Elmer Differential Scanning Calorimetry (DSC) แสดงดังภาคผนวก ข-1 โดยวิเคราะห์อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเจลาติน (Transition Temperature) และค่าพลังงานที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเจลาติน (Transition Enthalpy)

3) การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทดสอบความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมี สมบัติทางกายภาพและเชิงหน้าที่ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (MRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ ร้อยละ 95

3.4.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำวัสดุที่เจลาตินบางส่วนด้วยวิธีการตกตะกอน สารละลายเจลาตินจากหนังปลาบึกด้วยเอทานอล

สกัดเจลาตินตามสภาวะที่คัดเลือก จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาตกตะกอนด้วยเอทานอลโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Waglay, Karboune and Alli (2014) โดยตกตะกอนสารละลายเจลาตินจากหนังปลาบึกด้วยเอทานอลที่เย็นจัด ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ ร้อยละ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารละลาย เป็นเวลา 30 นาที และทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) และนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Waterborg, 2002) แสดงดังภาพผนวก ก-5 และคำนวณปริมาณร้อยละการตกตะกอนโปรตีน แสดงดังภาพผนวก ก-7

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (MRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ ร้อยละ 95 จากนั้นคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมมาตกตะกอนโปรตีน และนำเจลาตินที่ได้ไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมี-กายภาพของเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาบึกที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเอทานอล ดังข้อ 3.4.5

3.4.7 ศึกษาการเตรียมเม็ดเจลาตินจากหนังปลาบึกร่วมกับอัลจินต

ศึกษาการทำเม็ดบีทจากสารละลายเจลาตินจากหนังปลาบึกผสมกับอัลจินตโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang *et al.* (2016) เตรียมสารละลายเจลาตินจากหนังปลาบึก เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยละลายเจลาตินผงในน้ำกลั่น และนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส คนเป็นครั้งคราวจนเจลาตินละลาย และเตรียมสารละลายอัลจินต เข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยละลายอัลจินตผงในน้ำกลั่น นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และคนจนละลาย จากนั้นผสมสารละลายเจลาตินกับสารละลายอัลจินตเข้าด้วยกัน ทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเจลาตินจากหนังปลาบึก เท่ากับ ร้อยละ 0.5 และความเข้มข้นของ

อัลจินเต เท่ากับ ร้อยละ 1 และปรับ pH เป็น 4 และ 10.5 จากนั้นนำสารละลายผสมหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พร้อมคนตลอดเวลาโดยใช้กระบอกลีดา ขนาด 50 มิลลิลิตร แห่เม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลแข็งตัว จากนั้นนำเม็ดเจลไปล้างเพื่อกำจัดคลอไรด์ส่วนเกินออก โดยแช่ในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน เท่ากับ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำเม็ดเจลไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาศึกษาสมบัติ ดังต่อไปนี้

1. รูปทรงของเม็ดเจลภายใต้กล้องจุลทรรศน์
นำเม็ดเจลไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x เพื่อดูรูปทรงของเม็ดเจล
2. ขนาดของเม็ดเจลด้วยวิธีการคัดขนาด
นำเม็ดเจลไปร่อนผ่านตะแกรงคัดขนาด หมายเลข 8, 12, 18 และ 30 นาน 20 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักตะแกรงและคำนวณหาเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยโดยมวล ดังสมการที่ 7

$$\bar{D}_w = \sum_{i=1}^n (x_i \bar{D}_{pi}) \quad (7)$$

เมื่อ x_i คือ อัตราส่วน โดยมวลของอนุภาคในตะแกรงลำดับที่ i

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

3. ความสามารถในการดูดซับน้ำและการขยายตัวของเม็ดเจล
แช่เม็ดเจลในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน เท่ากับ 1:100 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเม็ดเจลมาชั่งน้ำหนักทุกๆ 30 นาที และคำนวณอัตราการขยายตัว ณ เวลาต่างๆ ดังสมการที่ 8

$$\text{อัตราการขยายตัว} = \frac{A - B}{B} \quad (8)$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักเม็ดเจล ณ เวลาใดๆ (กรัม)

B คือ น้ำหนักเม็ดเจลที่เวลา 0 (กรัม)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (MRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ ร้อยละ 95