บทที่ 3

การทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้

- ปลาทรายแดง *(Nemipterus hexodon)* และปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ซื้อจากตลาดปลาแม่กลองจังหวัดสมุทรสาคร ลำตัวปลามีสีชมพูใส เหงือกแดง และมีตาใส ขนส่งมายังห้องทดลองโดยทางรถยนต์ ขณะขนส่งใส่ปลาในถังพลาสติกที่หุ้มฉนวนกันความร้อน และรักษาความสดด้วยน้ำแข็งบดอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ขนส่งถึงห้องทดลองใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปลามีน้ำหนักเฉลี่ยตัวละประมาณ 200 กรัม

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (รุ่น BP 310S)
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (A & D company รุ่น HR – 200)
- เครื่องตีป่นไฟฟ้า (Moulinex รุ่น 241 กำลังไฟ 300 วัตต์)
- เครื่องเหวี่ยงแยก (centrifuge) (Heraeus รุ่น varifuge K)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorption spectrometer) (Jasco รุ่น V – 530)
- เครื่อง Homogenizer (Ystral GmbH D-7801 Dottingen X1020)
- ชุด minigel electrophoresis (Heofer รุ่น mini VE)
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Heto รุ่น DW8-85)(รูปในภาคผนวก จ)
- เครื่อง pH meter (Schott รุ่น CG 840)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath) (Julabo รุ่น SW 23)
- เครื่อง texture analyzer (รุ่น TA-XT2I)
- เครื่องวัดสี (Minolta croma meter รุ่น CR-300)
- เครื่องวัดการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (รุ่น OX-TRAN 1000)
- ตู้ทำแห้งแบบลมเป่าผ่านแผ่นหน้าฟิล์ม (ประกอบเอง) : รูปประกอบและรายละเอียดในภาคผนวก จ

- ขวดแก้วทรงกระบอกขนาดเล็ก และวงแหวนพลาสติกขนาดพอดีกับปากขวดแก้ว (รูปในภาคผนวก จ)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- ตู้อบ (Scientic promotion รุ่น WTB binder)
- Dialysis tube (12,000 – 14,000 Molecular weight cut off)
- เทอร์โมมิเตอร์ 0 ถึง 100 องศาเซลเซียส
- นาฬิกาจับเวลา
- แม่พิมพ์สำหรับขึ้นรูปฟิล์มทำจากซิลิโคน (รูปในภาคผนวก จ)
- Desiccator
- Disposable cuvettes
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
- ถุงพลาสติกชนิด low density polyethylene ยี่ห้อซิปล็อค (Zip Lock)
- เครื่องแก้วต่างๆ
- มีดและเขียง

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- น้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- น้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิห้อง
- น้ำกลั่น deionized
- ไดอัลดีไฮด์สตาร์ช (81.8% starch oxidation; Sigma, AR grade)
- ไขผึ้ง (beeswax) (Sigma, AR grade)(Melting point = 61.7-62.8^{o}C)
- เลซิทิน
- คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate) (Univar, AR grade)
- โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate) (Univar, AR grade)
- Bovine serum albumin (BSA) (Merck, reagent grade)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) (Univar, AR grade)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Univar, AR grade)
- กลีเซอรอล (Univar, AR grade)
- แมกนีเซียม ซัลเฟต (Univar, AR grade)
- ซิลิโคนกรีส (silicone grease)

- ซิลิกาบีด (silica bead)
- โปรตีนมาตรฐานสำหรับ SDS-PAGE electrophoresis (ผลิตโดยบริษัท Amersham Phamacia Biotech) ประกอบด้วย phophorylase b (97 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa) และ α-lactoalbumin (14.4 kDa)
- Acrylamide (Wako, reagent grade)
- Bis-acrylamide (Wako, reagent grade)
- Tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris-HCl pH 8.8) (Wako, reagent grade)
- Tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris-HCl pH 6.8) (Wako, reagent grade)
- Sodium dodecyl sulphate (SDS) (BDH, reagent grade)
- Ammonium persulphate (Univar, AR grade)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (Merck, reagent grade)
- 2-mercapto ethanol (Merck, reagent grade)
- Bromphenol blue (UBS, reagent grade)
- Coomassie brilliant blue (CBB) (Fluka, reagent grade)
- Methyl alcohol (Scharlau, AR grade)
- Acetic acid (BDH, AR grade)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาทรายแดง *(Nemipterus hexodon)* และปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*)

- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีมาตรฐาน A.O.A.C. (1995)
- วิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยวิธีมาตรฐาน A.O.A.C. (1995)
- วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธีมาตรฐาน A.O.A.C. (1995)
- ปริมาณคาร์โบไฮเดรต : 100 – (%โปรตีน +%ไขมัน + %ความชื้น + %เถ้า)

ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2 การสกัดและการหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (water soluble protein) ที่สกัดได้จากปลาทรายแดง (*Nemipterus hexodon)* และปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*)

นำปลาสดมาล้างให้สะอาด แยกเอาเครื่องใน ก้างและหนังออก ให้เหลือเฉพาะเนื้อปลา สับเนื้อปลาให้ละเอียด แล้วนำมาปั่นผสม (homogenize) กับน้ำกลั่นเย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักเนื้อปลา ด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3600 ×g เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายส่วนบน (supernatant) ไปทำ dialysis ในน้ำกลั่นเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำทุก 24 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3600 ×g เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำสารละลายส่วนบนไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิประมาณ -72 องศาเซลเซียส จะได้โปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลาในรูปผงแห้งสีขาวนวล (Wahyni, Ishizaki, and Tanaka, 1999)

นำโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลาที่สกัดได้ด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้ว มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลา และคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ และคำนวณเป็นร้อยละของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเนื้อปลาที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 3.2.1

จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนผงที่สกัดได้จากวิธีข้างต้น โดยใช้วิธี Biuret assay (Copeland, 1994) ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนละลายน้ำได้จากปลาทรายแดง *(Nemipterus hexodon)* และปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) โดยวิธี AccQ.Tag ของ Waters (Liu et al., 1995)

3.2.4 การศึกษาผลของปริมาณไดอัลดีไฮด์สตาร์ชและ pH ที่มีต่อสมบัติด้านต่างๆของการดัดแปรฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำด้วยไดอัลดีไฮด์สตาร์ช

3.2.4.1 การผลิตฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำได้จากปลาดัดแปรด้วยไดอัลดีไฮด์สตาร์ช (Iwata et al., 2000)

เตรียมสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม (film-forming solution) โดยละลายโปรตีนปลาละลายน้ำได้ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นโปรตีน 3% โดยน้ำหนัก แล้วเติมไดอัลดีไฮด์สตาร์ช ปริมาณ 0, 2.5, 5, 7.5 หรือ 10% โดยน้ำหนักของโปรตีน จากนั้นปรับ pH ของสารละลายขึ้นรูปฟิล์มให้ได้ตามต้องการ โดยในขั้นนี้จะแปร pH ของ

สารละลายขึ้นรูปฟิล์มเป็น 8, 9, 10, 11, 12 แล้วจึงเติมพลาสติไซเซอร์ คือ กลีเซอรอล 50% โดยน้ำหนักแห้งของปริมาณโปรตีนที่ใช้ จากนั้นให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีน 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายขึ้นรูปฟิล์มที่เตรียมได้มาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม โดยปิเปตสารละลายขึ้นรูปฟิล์มปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในแผ่นแม่พิมพ์ซิลิโคน (silicone plate) ขนาด 5 × 5 เซนติเมตร เกลี่ยสารละลายให้กระจายทั่วแม่พิมพ์ซิลิโคน จากนั้นนำมาทำแห้งในตู้เป่าลม (ประกอบเอง) (รูปในภาคผนวก จ.) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จะได้แผ่นฟิล์มที่แห้ง แล้วจึงลอกแผ่นฟิล์มออกจากแม่พิมพ์ซิลิโคน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 ± 5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ (%RH) 50 ± 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาวิเคราะห์สมบัติต่างๆต่อไป

ควบคุมความหนาของแผ่นฟิล์ม (0.045 ± 0.002 mm) โดยคำนวณปริมาณของแข็งทั้งหมดของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม (โปรตีนปลาละลายน้ำได้, ไดอัลดีไฮด์สตาร์ช และกลีเซอรอล) ในแต่ละตัวอย่างให้เท่ากัน

3.2.4.2 การวิเคราะห์สมบัติต่างๆของฟิล์มบริโภคได้

- ค่าต้านทานแรงดึงขาด และค่าร้อยละการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์ม โดยวิธีมาตรฐาน ASTM D 882 (1999)
- ค่าสีในระบบ Hunter L a b : เครื่อง Minolta รุ่น Minolta รุ่น CR-300
- ค่าการละลายทั้งหมด (total soluble matter) ของฟิล์ม ตามวิธีของ Jangchud และ Chinnan (1999)
- ค่าการซึมผ่านของไอน้ำ โดยวิธีมาตรฐาน ASTM ซึ่งปรับปรุงและรายงานไว้โดย Gontard, Guilbert และ Cuq (1992)
- ค่าการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน โดยวิธีมาตรฐาน ASTM D 3985 – 95 (1999)

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Design 5 × 5 โดยแปร pH ของสารละลายเป็น 8, 9, 10, 11 หรือ 12 และแปรปริมาณไดอัลดีไฮด์สตาร์ชเป็น 0, 2.5, 5, 7.5 หรือ 10 ของปริมาโปรตีน และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test เพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.4.3 การติดตามผลการเกิดเชื่อมขวางของโปรตีนที่ดัดแปรด้วยไดอัลดีไฮด์สตาร์ช โดยวิธี SDS-PAGE

ศึกษาแบบแผนการแยกของโปรตีน (Protein pattern) ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลาซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ รวมทั้งการเกิดเชื่อมขวางของโปรตีนที่ดัดแปรด้วยไดอัลดีไฮด์สตาร์ช ในการวิเคราะห์ใช้ 12.5% separating gel และ 4% stacking gel โดยจะวิเคราะห์ตัวอย่างจากตัวอย่างที่มีค่าการต้านทานแรงดึงสูงสุดที่วัดได้จากข้อ 3.2.4.2 ดังต่อไปนี้

- สารละลายโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดง 3% โดยน้ำหนัก
- แผ่นฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดงดัดแปรด้วยไดอัลดีไฮด์สตาร์ช 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10 % ของปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ตัวอย่างข้างต้นด้วย SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ซึ่งปรับปรุงโดย Iwata และคณะ (2000)

3.2.5 การศึกษาผลของการเติมไขผึ้ง (Beeswax) ที่มีต่อสมบัติด้านต่างๆของฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำ

3.2.5.1 การผลิตฟิล์มบริโภคได้จากสารละลายอีมัลชั่นของโปรตีนละลายน้ำได้จากปลาและไขผึ้ง(Tanaka et al., 2001b)

เตรียมสารละลายอีมัลชั่นสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม โดยละลายโปรตีนปลาละลายน้ำได้ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่ยือกแข็งแล้วในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 3% โดยน้ำหนัก แล้วเติมไดอัลดีไฮด์สตาร์ช ปริมาณ 7.5% โดยน้ำหนักของโปรตีน จากนั้นปรับ pH ของสารละลายขึ้นรูปฟิล์มเป็น 9 แล้วจึงเติมพลาสติไซเซอร์ คือ กลีเซอรอล 50% โดยน้ำหนักแห้งของปริมาณโปรตีนที่ใช้ จากนั้นให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีน 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเติมไขผึ้งปริมาณ 20, 30, หรือ 40% ของโปรตีนปลา พร้อมกับเติมเลซิทิน เพื่อเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในปริมาณ 10 % โดยน้ำหนักของไขผึ้งที่ใช้ นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยโฮโมจีไนเซอร์ เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้อุณหภูมิขณะที่โฮโมจีไนซ์ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายอีมัลชั่นสำหรับขึ้นรูปฟิล์มที่เตรียมได้มาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม เช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.4.1

ควบคุมความหนาของแผ่นฟิล์ม (0.045 ± 0.002 mm) โดยคำนวณปริมาณของแข็งทั้งหมดของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม (โปรตีนปลาละลายน้ำได้, ไดอัลดีไฮด์สตาร์ช, กลีเซอรอล และไขผึ้ง) ในแต่ละตัวอย่างให้เท่ากัน

3.2.5.2 การวิเคราะห์สมบัติต่างๆของฟิล์มบริโภคได้

ตรวจสอบสมบัติต่างๆของฟิล์มเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.4.2

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0.5 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range tests

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย