บทที่ 3

การทดลอง

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้

- ปลาทรายแดง(*Nemipterus hexodon*) จากตลาดปลาแม่กลองจังหวัดสมุทรสาคร ลำตัวปลามีสีชมพูใส เหงือกแดง และมีตาใส

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)
- ชุด minigel electrophoresis (Heofer รุ่น mini VE)
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Heto รุ่น DW8-85)
- เครื่อง pH meter (Schott รุ่น CG 840)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath) (Julabo รุ่น SW 23)
- เครื่อง Texture analyzer (รุ่น TA-XT2i)
- กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) รุ่น JSM-5410 LV
- เครื่องวัดสี (Minolta croma meter รุ่น CR-300)
- เครื่องวัดอัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน (รุ่น OX – TRAN 1000)
- ตู้ทำแห้งแบบเป่าลมผ่านผิวหน้าฟิล์ม (ประกอบเอง) : รูปและรายละเอียดในภาคผนวก จ.
- ขวดแก้วทรงกระบอกขนาดเล็ก และวงแหวนพลาสติกขนาดพอดีกับปากขวดแก้ว (รูปในภาคผนวก จ.)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- ตู้อบ (Scientific promotion รุ่น WTB binder)

- Dialysis tube
- เทอร์โมมิเตอร์ 0 ถึง 100 องศาเซลเซียส
- นาฬิกาจับเวลา
- แม่พิมพ์สำหรับขึ้นรูปฟิล์ม ทำจากซิลิโคน
- Desiccator
- Disposable cuvettes
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
- ถุงพลาสติกชนิด low density polyethylene ยี่ห้อซิปล็อค (Zip Lock)
- เครื่องแก้วต่างๆ
- มีด และ เขียง

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- น้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- น้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง
- น้ำกลั่น deionized
- คอปเปอร์ซัลเฟต (Univar, AR grade)
- โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรท (Univar, AR grade)
- Bovine serum albumin (BSA) (Merck, reagent grade)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Univar, AR grade)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Univar, AR grade)
- กลีเซอรอล (glycerol) (Univar, AR grade)
- แมกนีเซียม ซัลเฟต (Univar, AR grade)
- ซอร์บิทอล (sorbitol) (Univar, AR grade)
- โพลีเอททิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) (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 innibiter (20.1 kDa) และ α-lactalbumin (14.4kDa)
- Acrylamide (Wako, reagent grade)

- Bis-acrylamide (Wako, reagent grade)
- Tris(hydroxymethyl) aminomethene (Tris-HCl pH 8.8) (Wako, reagent grade)
- Tris(hydroxymethyl) aminomethene (Tris-HCl pH 6.8) (Wako, reagent grade)
- Sodium dodesyl sulphate (SDS) (BDH, reagent grade)
- Ammonium persulfate (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*)

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

ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2 การสกัดและการหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (water soluble protein) ที่สกัดได้จากปลาทรายแดง

นำปลาทรายแดงสดมาล้างให้สะอาด แยกเอาเครื่องใน ก้าง และหนังออก ให้เหลือเฉพาะเนื้อปลา สับเนื้อปลาให้ละเอียด แล้วนำมาปั่นผสม (homogenization) กับน้ำกลั่นเย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักเนื้อปลา ด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3600 x g เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายส่วนบน (supernatant) ไปทำ dialysis ในน้ำกลั่นเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำทุก 24 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3600 x g เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำสารละลายส่วนบนไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิประมาณ -72 องศาเซลเซียส จะได้โปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลาทรายแดงในรูปผงแห้งสีขาวนวล (Wahyni, Ishizaki, and Tanaka, 1999)

เมื่อสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลาทรายแดงด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้ว จึงคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลาทรายแดง และคำนวณเป็นร้อยละของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเนื้อปลาทรายแดงที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 3.2.1

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

3.2.3 การศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิในการให้ความร้อนที่มีต่อสมบัติด้านต่าง ๆ ของฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดง

3.2.3.1 การผลิตฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดง (Iwata *et al.*, 2000)

เตรียม film-forming solution โดยละลาย freeze – dried fish water soluble proteins 3.07 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (ละลายในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร) จะได้สารละลายโปรตีนความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก จากนั้นปรับ pH ของสารละลายโปรตีนให้ได้ตามต้องการ โดยในขั้นนี้จะแปร pH ของ film-forming solution เป็น 5 ระดับ คือ 3 5 7 9 และ 11 แล้วจึงเติมพลาสติไซเซอร์ คือ กลีเซอรอล 50% โดยน้ำหนักแห้งของปริมาณโปรตีนที่ใช้ จากนั้นให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนโดยแปรอุณหภูมิในการให้ความร้อนเป็น 4 ระดับ คือ 60 70 80 และ 90 องศาเซลเซียส เวลาในการให้ความร้อนคงที่ที่ 15 นาที แล้วนำ film forming solution ที่เตรียมได้มาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มโดยปิเปต film-

forming solution ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในแม่พิมพ์ซิลิโคน (silicone plate) ขนาด 5 x 5 เซ็นติเมตร เกลี่ยสารละลายให้กระจายทั่วแผ่นแม่พิมพ์ซิลิโคน 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 ก่อนนำมาวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ต่อไป

3.2.3.2 การวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ของฟิล์มบริโภคได้

ค่าการต้านทานแรงดึงขาด และค่าร้อยละการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์ม โดยวิธีมาตรฐาน ASTM D 882 (1999)

ค่าการซึมผ่านของไอน้ำ โดยวิธีมาตรฐาน ASTM ซึ่งปรับปรุงและรายงานไว้โดย Gontard, Guilbert และ Cuq (1992)

ค่าการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน โดยวิธีมาตรฐาน ASTM D 3985 – 95 (1999)

ค่าการละลายทั้งหมด (total solubility) ของฟิล์ม ตามวิธีของ Jangchud และ Chinnan (1999)

ค่าสี ในระบบ L a b : เครื่อง Minolta รุ่น CR-300

วางแผนการทดลองแบบ asymmetric factorial CRD ขนาด 5 x 4 ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 7.5 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.2.3.3 การตรวจสอบลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของแผ่นฟิล์มโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

ศึกษาลักษณะพื้นผิวและภาพตัดขวาง (cross-section) ของฟิล์มที่ pH 3 และ 11 และให้ความร้อนที่ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส และศึกษาพื้นผิวและภาพตัดขวางของฟิล์มมีค่าการต้านทานแรงดึงขาดสูงสุดที่วัดได้จากข้อ 3.2.3.2 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

3.2.3.4 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตแผ่นฟิล์มบริโภคได้ โดยวิธี SDS-PAGE electrophoresis

ศึกษาแบบแผนการแยกของโปรตีน (protein pattern) ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลาทรายแดงซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตฟิล์มบริโภคได้ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโปรตีนนั้นๆ จากการปรับ pH และการให้ความร้อนในการเตรียม film-forming solution ในการวิเคราะห์ใช้ 12.5% separating gel และ 4% stacking gel โดยจะวิเคราะห์จากตัวอย่างที่มีค่าการต้านทานแรงดึงขาดสูงสุดที่วัดได้จากข้อ 3.2.3.2 ดังต่อไปนี้

- สารละลายโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลาทรายแดง 3% w/v
- Film-forming solution ที่ปรับ pH แล้ว แต่ยังไม่ผ่านการให้ความร้อน และไม่มีการเติม 2- mercaptoethanol ในการวิเคราะห์
- Film-forming solution ที่ปรับ pH และให้ความร้อนเรียบร้อยแล้ว และไม่มีการเติม 2- mercaptoethanol ในการวิเคราะห์
- Film-forming solution ที่ปรับแล้ว แต่ยังไม่ผ่านการให้ความร้อน และเติม 2-mercaptoethanol ในการวิเคราะห์
- Film forming solution ที่ปรับ pH และให้ความร้อนเรียบร้อยแล้ว และเติม 2-mercaptoethanol ในการวิเคราะห์

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

3.2.4 การศึกษาผลของชนิดและปริมาณพลาสติไซเซอร์ที่มีต่อสมบัติด้านต่าง ๆ ของฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดง

3.2.4.1 การผลิตแผ่นฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดงโดยใช้ชนิดและปริมาณพลาสติไซเซอร์ต่างกัน

ผลิตฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดงเช่นเดียวกับวิธีการผลิตในข้อ 3.2.3.1 โดยปรับภาวะในการผลิต (pH และอุณหภูมิในการให้ความร้อน) เช่นเดียวกับตัวอย่างที่มีค่าการต้านทานแรงดึงขาดสูงสุดที่วัดได้จากข้อ 3.2.3.2

3.2.4.2 ปัจจัยที่ศึกษา

ใช้พลาสติไซเซอร์ 3 ชนิด ได้แก่ กลีเซอรอล (GLY) ซอร์บิทอล (SOR) และโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG)

โดยแปรปริมาณพลาสติไซเซอร์ 3 ระดับ ได้แก่ 40 50 และ 60% โดยน้ำหนักของโปรตีนที่ใช้ในการผลิตแผ่นฟิล์ม

3.2.4.3 การตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของฟิล์มบริโภคได้

ตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของฟิล์มเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.3.2

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 7.5 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.2.4.4 การตรวจสอบลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของแผ่นฟิล์มโดยใช้กล้อง-จุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

ศึกษาลักษณะพื้นผิวและภาพตัดขวางของฟิล์มที่ผลิตโดยใช้ กลีเซอรอล ซอร์บิทอล และ โพลีเอททิลีนไกลคอล ปริมาณ 50% โดยน้ำหนักของโปรตีนที่ใช้ เป็นพลาสติ-ไซเซอร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

3.2.5 การศึกษาผลของอายุการเก็บที่มีต่อสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม

3.2.5.1 การผลิตแผ่นฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดง

ผลิตฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดงเช่นเดียวกับวิธีการผลิตในข้อ 3.2.3.1 โดยปรับภาวะในการผลิต (pH และอุณหภูมิในการให้ความร้อน) เช่นเดียวกับตัวอย่างที่มีค่าการต้านทานแรงดึงขาดสูงสุดที่วัดได้จากข้อ 3.2.3.2 และใช้ชนิดและปริมาณของพลาสติไซเซอร์ที่ทำให้แผ่นฟิล์มมีค่าการต้านทานแรงดึงขาดสูงที่สุดจากข้อ 3.2.4.3

3.2.5.2 การเก็บรักษาและการตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของฟิล์มบริโภคได้

เก็บแผ่นฟิล์มบริโภคได้ทั้ง 2 ชนิดที่ผลิตได้ในข้อ 3.2.5.1 ไว้ในถุงพลาสติกชนิด low density polyethylene ยี่ห้อซิปล็อค วางถุงที่บรรจุแผ่นฟิล์มไว้ภายใน ที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 5 องศาเซลเซียส) และตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของแผ่นฟิล์มเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.3.2 ทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 7.5 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test