

การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอก
โดยใช้แอลคาไลน์โปรทีเอส



นางสาว ปาริชาติ ลบแยม

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-3768-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXTRACTION AND PURIFICATION OF GELATIN FROM RAW HIDE WASTE
USING ALKALINE PROTEASE

Miss Parichat Lobyuem



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-3768-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้แอลคาไลน์โปรทีเอส

โดย นางสาว ปารีชาติ ลบรัมย์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

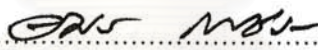
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส


อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

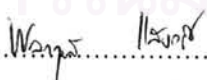

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวนิช)

ปาริชาติ ลบแยม : การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้แอลคาไลน์โปรทีเอส (EXTRACTION AND PURIFICATION OF GELATIN FROM RAW HIDE WASTE USING ALKALINE PROTEASE) อ. ที่ปรึกษา : .ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร.ศิริพร คำรงค์ศักดิ์กุล, 162 หน้า. ISBN 974-17-3768-8.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอก โดยใช้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรทีเอส โดยในส่วนของ การสกัดเจลาติน ได้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีความสำคัญในการสกัด ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ (0-10,000 U/mg) เวลา (20-180 นาที) อุณหภูมิ (40-60 องศาเซลเซียส) และ pH (8-11) แล้วนำผลที่ได้มาทำการประมวลผลวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน เพื่อหาความมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละปัจจัย และ อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่ใช้ในการสกัด กับสมบัติที่สำคัญของเจลาติน คือ ค่าความแข็งแรงของเจล และ ความหนืด โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลา อุณหภูมิ pH และ อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสี่มีผลต่อค่าความแข็งแรงของเจลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยค่าความแข็งแรงของเจลที่สกัดได้อยู่ในช่วง 4.6-165.8 g Bloom ส่วนความหนืด พบว่า เวลา อุณหภูมิ pH และ อิทธิพลร่วมระหว่าง ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ pH เท่านั้นที่มีผลต่อความหนืดของเจลอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าความหนืดอยู่ในช่วง 1.59-3.07 cP

การศึกษาในส่วนการทำบริสุทธิ์เจลาติน พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินที่ได้ว่ามีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกับสมบัติที่สำคัญของเจลาติน คือ ค่าความแข็งแรงของเจล และ ความหนืด ซึ่งจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินสูงขึ้น โดยที่น้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินอยู่ในช่วง 100 กิโลดัลตัน จะมีค่าความแข็งแรงของเจล และ ความหนืดมากกว่า 160 g Bloom และ 3.00 cP ตามลำดับ

การศึกษาสมบัติทางเคมี และกายภาพของเจลาตินด้านอื่น ได้แก่ การละลาย pH ที่ ปริมาณสารหนู ตะกั่ว โลหะหนัก และ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ความชื้น ไขมัน และการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด เปรียบเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พบว่า อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนในเจลาติน พบว่า องค์ประกอบหลักของเจลาตินประกอบด้วย ไกลซีน ร้อยละ 26 โพลีน ร้อยละ 15 กรดกลูตามิก ร้อยละ 11 อาร์จีนีน ร้อยละ 10 อะลานีน ร้อยละ 9.9 กรดแอสปาร์ติก ร้อยละ 6 และ กรดอะมิโนอื่น ๆ ร้อยละ 22.1

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....

ปีการศึกษา.....2548.....

ลายมือชื่อนิสิต.....ปาริชาติ.....ลบแยม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*Dr. H.*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*Dr. S.*.....

4572382123 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: GELATIN / COLLAGEN / ALKALINE PROTEASE / EXTRACTION / RAW HIDE

PARICHAT LOBYAEM : EXTRACTION AND PURIFICATION OF GELATIN FROM RAW HIDE WASTE USING ALKALINE PROTEASE. THESIS ADVISOR: KITTINAN KOMOLPIS, Ph. D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph. D., 162 pp. ISBN 974-17-3768-8.

This research focused on the extraction and purification of gelatin from raw hide waste using alkaline protease (Savinase 12T). The effect of extraction conditions including enzyme concentration (0-10,000 U/mg), time (20-180 min), temperature (40-60 °C) and pH (8-11) on the properties of gelatin was investigated. The results were then analyzed by a statistical program, Duncan's New Multiple Range test, to determine the extraction factors that significantly affected the important properties of gelatin, e.g. gel strength and viscosity. The analyses showed that enzyme concentration, time, temperature, pH and their interaction affected the gel strength at 95% confident level and the gel strength ranged between 4.6-165.8 g Bloom. In case of viscosity, only time, temperature, pH and their interaction significantly affected the viscosity which ranged between 1.59-3.07 cP.

In the purification study, it was found that the molecular weight of gelatin varied directly with the gel strength and viscosity. The higher the molecular weight higher the gel strength and the viscosity. The molecular weight of gelatin was in the range of 100 K Da, which was corresponded to the gel strength and the viscosity of 160 g Bloom and 3.00 cP respectively.

Chemical and physical properties of gelatin including solubility, pH, color, amount of As, Cu, Pb, S, Zn, moisture, fat, and colony forming unit were tested. The results showed that all properties were approved by Thai Industrial Standard of gelatin. Finally, the analysis of amino acid composition showed that the main components of gelatin were 26 % glycine, 15 % proline, 11 % glutamic acid, 10 % arginine, 9.9 % alanine, 6 % aspartic acid and 22.1 % other amino acids.

Department.....Biotechnology.....

Field of study....Biotechnology...

Academic year...2005.....

Student's signature.....*Parichat Lobyam*.....

Advisor's signature.....*K. Komolpis*.....

Co-advisor's signature.....*Siriporn Damrongsakkul*.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร คำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็น และคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ และผู้บริหารของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่านสำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยทุกชิ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ชิดารัตน์ เอกสิทธิกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร. นवलวี เวชประสิทธิ์ ที่ทำให้มี ปริชาติ ในวันนี้

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ นักวิจัย ดร.ศิรินทิพ สุกใส คุณมะลิวัลย์ จรรยาวิชกุล คุณทรงจันทร์ กุ่ทอง คุณศจี น้อยตั้ง เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่าน และ พี่ ๆ ทีมช่างเทคนิครวมทั้งพนักงานขับรถของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำ รวมทั้งกำลังใจที่มีให้ในทุก ๆ เรื่อง ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ ทุกคน และคนสำคัญที่สุด คุณเอกภพ งามละเมียด ที่เป็นกำลังใจ คอยให้การสนับสนุนพร้อมทั้งให้ความช่วยในทุก ๆ ด้านตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดาผู้ให้กำเนิด แม่ น้ำเดือน คุณตา ที่ให้ความรัก ให้ความเข้าใจ ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 แนวคิดและทฤษฎี	5
2.1.1 หนังสือตัว	5
2.1.2 เจาะดิน.....	7
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
2.3 สมมติฐาน.....	24
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	26
3.2 ตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	28
3.3 การดำเนินงานวิจัย	30
3.4 ขั้นตอนการวิจัย	30

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	38
4.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Savinase 12T โดยวิธี Azo-casein hydrolysis.....	38
4.2 การศึกษาคุณสมบัติของตัวอย่างหนังเปียกเริ่มต้น.....	39
4.3 ศึกษาการสกัดเจลาตินจากหนังที่ยังไม่ผ่านการฟอก.....	40
4.4 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของเจลาติน.....	52
4.5 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ.....	69
4.6 การศึกษาการทำบริสุทธิ์ของเจลาติน.....	82
4.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของเจลาติน.....	85
4.8 ศึกษาถึงค่า pI.....	93
4.9 ศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาตินผง.....	95
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	97
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	97
5.2 ข้อเสนอแนะ	98
รายการอ้างอิง	99
ภาคผนวก	105
ภาคผนวก ก	106
ภาคผนวก ข	113
ภาคผนวก ค	117
ภาคผนวก ง.....	120
ภาคผนวก จ.....	127
ภาคผนวก ฉ.....	157
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	162

สารบัญญัตราง

ตารางที่	หน้า
2.1	องค์ประกอบของเจลละดิน..... 9
2.2	สมบัติที่สำคัญของเจลละดินที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร..... 17
2.3	ตัวอย่างปริมาณและค่าความแข็งแรงของเจลในเจลละดินที่ใช้เป็นส่วนประกอบใน อุตสาหกรรมอาหาร..... 18
2.4	สมบัติที่สำคัญของเจลละดินที่นำมาใช้ในการผลิตแคลชูลยชาชนิดแข็ง..... 19
2.5	สมบัติที่สำคัญของเจลละดินที่นำมาใช้ในการผลิตแคลชูลยชาชนิดอ่อน..... 19
2.6	สมบัติที่สำคัญของเจลละดินที่นำมาใช้ในการผลิตยาเม็ด..... 20
2.7	สมบัติที่สำคัญของเจลละดินที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมภาพถ่าย..... 20
3.1	วัตถุดิบ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 28
4.1	ค่าความเป็นกรด-ด่างและองค์ประกอบของหน้กเปียกที่ใช้ในการทดลอง..... 40
4.2	ปริมาณธาตุที่พบในเจลละดินที่สกัดได้เปรียบเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.).. 65
4.3	ปริมาณความชื้นที่พบในตัวอย่างหน้กสดและเจลละดิน..... 66
4.4	ปริมาณเ้าที่พบในตัวอย่างหน้กสด และ เจลละดิน..... 67
4.5	ปริมาณไขมันที่พบในเจลละดินที่สกัดได้เปรียบเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.)..... 68
4.6	จำนวนจุลินทรีย์ที่พบในเจลละดินที่สกัดได้เปรียบเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.)..... 69
4.7	ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความแข็งแรงของเจลเนื่องจาก ความเข้มข้น ของเอนไซม์ เวลา อุณหภูมิ และ pH ในกระบวนการสกัด..... 70
4.8	ค่าความแข็งแรงของเจลที่ช่วงเวลาต่าง ๆที่ใช้ในการสกัดเจลละดิน..... 71
4.9	ค่าความแข็งแรงของเจลที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆที่ใช้ในการสกัดเจลละดิน..... 72
4.10	ค่าความแข็งแรงของเจลที่อุณหภูมิต่าง ๆที่ใช้ในการสกัดเจลละดิน..... 73
4.11	ค่าความแข็งแรงของเจลที่ pH ต่าง ๆที่ใช้ในการสกัดเจลละดิน..... 74
4.12	ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความหนืดของเจลเนื่องจาก ความเข้มข้น ของเอนไซม์ เวลา อุณหภูมิ และ pH ในกระบวนการสกัด..... 75
4.13	ค่าความหนืดของเจลที่ช่วงเวลาต่าง ๆที่ใช้ในการสกัดเจลละดิน..... 76

ตารางที่	หน้า	
4.14	ค่าความหนืดของเจลที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเจลดิน.....	77
4.15	ค่าความหนืดของเจลที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเจลดิน.....	78
4.16	ค่าความหนืดของเจลที่ pH ต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเจลดิน.....	79
4.17	เปรียบเทียบค่า pI และ น้ำหนักโมเลกุลของเจลดินที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ.....	95
4.18	ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนของตัวอย่างแห้งสด และ เจลดินที่สกัดได้เทียบกับ เจลดินในอุตสาหกรรม.....	96
ก.1	องค์ประกอบของเจลดินที่มีความบริสุทธิ์สูง.....	106
ก.2	ผลลัพธ์แสดงค่าสถิติพรรณนาของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความแข็งแรงของเจล.	107
ก.3	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ และ ค่า F และ ค่า Sig ที่เปลี่ยนไปของสภาวะที่ใช้ในการ สกัดกับค่าความแข็งแรงของเจล	108
ก.4	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความ แข็งแรงของเจล	108
ก.5	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย และการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระแต่ละ ตัวกับตัวแปรตามของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความแข็งแรงของเจล.....	109
ก.6	ผลลัพธ์ของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlations) ระหว่างตัวแปรต่างๆ ของ สภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความแข็งแรงของเจล	110
ก.7	ผลลัพธ์แสดงค่าสถิติพรรณนาของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความหนืด.....	111
ก.8	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ และ ค่า F และ ค่า Sig ที่เปลี่ยนไปของสภาวะที่ใช้ในการ สกัดกับค่าความหนืด.....	111
ก.9	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่า ความหนืด.....	111
ก.10	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย และการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระแต่ละ ตัวกับตัวแปรตามของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความหนืด.....	112
ก.11	ผลลัพธ์ของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlations) ระหว่างตัวแปรต่างๆ ของ สภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความหนืด.....	112
ข.1	การเตรียมสารที่ใช้ในการทำโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส.....	114
ข.2	การเตรียมสารที่ใช้ในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	115
จ.1	น้ำหนักของเจลดินผงที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 อัตราคววน 100 รอบต่อนาที.....	127

ตารางที่	หน้า
จ.2 ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 อัตราควน 100 รอบต่อนาที.....	128
จ.3 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของ เอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0.....	129
จ.4 ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0.....	130
จ.5 น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	131
จ.6 น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	132
จ.7 น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	133
จ.8 น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	134
จ.9 ปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	135
จ.10 ปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	136
จ.11 ปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	137
จ.12 ปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	138
จ.13 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	139
จ.14 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	140
จ.15 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	141
จ.16 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	142

ตารางที่	หน้า	
จ.17	ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	143
จ.18	ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	144
จ.19	ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	145
จ.20	ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	146
จ.21	น้ำหนักแห้ง ปริมาณ โปรตีน ความแข็งแรงของเจล และความหนืดที่สูงที่สุดของ เจลละติน ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0.....	147
จ.22	น้ำหนักแห้ง ปริมาณ โปรตีน ความแข็งแรงของเจล และความหนืดที่สูงที่สุดของ เจลละติน ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง.ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส.....	148
จ.23	ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	149
จ.24	ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	150
จ.25	ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	151
จ.26	ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	152
จ.27	ค่าสีเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	153
จ.28	ค่าสีเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	154
จ.29	ค่าสีเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	155
จ.30	ค่าสีเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	156

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบและปริมาณ โดยเฉลี่ยของหนังสือตัว.....	5
2.2 โครงสร้างของหนังสือตัว	6
2.3 พันธะโควาเลนต์และพันธะไฮโดรเจน ของเจลละติน.....	8
2.4 a) แสดงการวางตัวของโมเลกุลโทรโพลลลาเจนไฟบริล	8
b) ภาพแสดงคอลลาเจนไฟบริล.....	8
2.5 ปริมาณแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ที่พบในเจลละติน	10
2.6 การเปลี่ยนแปลงจากคอลลาเจนเป็นเจลละติน.....	10
2.7 โครงสร้างของเจลละติน.....	11
2.8 การเกิดเจลของเจลละติน	14
4.1 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์ Savinase 12T	38
4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ Savinase 12T	39
4.3 น้ำหนักของเจลละตินผงที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0.....	41
4.4 ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0.....	42
4.5 น้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0.....	43
4.6 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของ เอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0.....	44
4.7 ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของ เอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0.....	45
4.8 ค่าความแข็งแรงของเจลกับความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความ เข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0...	45
4.9 น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	47
4.10 น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	47
4.11 น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	48

รูปที่	หน้า	
4.12	น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	48
4.13	ปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	50
4.14	ปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	50
4.15	ปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	51
4.16	ปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	51
4.17	น้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	52
4.18	ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	54
4.19	ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	54
4.20	ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	55
4.21	ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	55
4.22	ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	57
4.23	ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	57
4.24	ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	58

รูปที่	หน้า
4.25 ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช่เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	58
4.26 ค่าความแข็งแรงแรงเจลและความหนืดเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	59
4.27 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	60
4.28 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	61
4.29 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	61
4.30 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช่เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	62
4.31 ค่าสีเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	63
4.32 ค่าสีเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	63
4.33 ค่าสีเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	64
4.34 ค่าสีเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช่เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ.....	64
4.35 โครมาโตแกรมจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ของเจลละตินที่ได้จากการสกัด ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 8.0.....	82
4.36 โครมาโตแกรมจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ของเจลละตินที่ได้จากการสกัด โดยไม่ใช่เอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 9.5.....	83
4.37 โครมาโตแกรมจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ของเจลละตินที่ได้จากการสกัด ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 9.5.....	84

รูปที่	หน้า	
4.38	โครมาโตแกรมจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 11.0.....	85
4.39	10%T Polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเอนไซม์จากการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ หลังจากผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100.....	87
4.40	10%T Polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเอนไซม์จากการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ.....	88
4.41	10%T Polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเอนไซม์จากการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ.....	90
4.42	10%T Polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเอนไซม์จากการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ.....	91
4.43	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์กับค่าความแข็งแรงและความหนืดของเอนไซม์ของเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองสกัดด้วยเอนไซม์ Savinase 12T.....	92
4.44	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์กับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์.....	93
4.45	Isofocusing polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ	94
ง.1	กราฟมาตรฐานของ BSA ในการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's ของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดที่ pH 8 และ 9.5 ที่เวลา ความเข้มข้นของเอนไซม์ และอุณหภูมิต่าง ๆ	120
ง.2	กราฟมาตรฐานของ BSA ในการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's ของตัวอย่างแห้ง และเอนไซม์มาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง.....	120
ง.3	กราฟมาตรฐานของ BSA ในการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's ของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดที่ pH 11 ที่เวลา ความเข้มข้นของเอนไซม์ และอุณหภูมิต่าง ๆ.....	121
ง.4	กราฟมาตรฐานของ BSA ในการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's.....	121
ง.5	กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี Native PAGE	122

รูปที่	หน้า
ง.6 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนัก โมเลกุล ด้วยวิธี Native PAGE	122
ง.7 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนัก โมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE	123
ง.8 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนัก โมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE	123
ง.9 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนัก โมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE	124
ง.10 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนัก โมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE	124
ง.11 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนัก โมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE	125
ง.12 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนัก โมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE	125
ง.13 กราฟมาตรฐานของ pI (เมื่อวัดระยะทางการเคลื่อนที่จากขั้วบวกไปยังขั้วลบ) ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และค่า pI ด้วยวิธี IEF	126
ฉ.1 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในตัวอย่างหนึ่งเป็ยก โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ (ครั้งที่ 1).....	157
ฉ.2 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในตัวอย่างหนึ่งเป็ยก โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ (ครั้งที่ 2).....	158
ฉ.3 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในตัวอย่างเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้น ของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที และ pH 9.5 โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ (ครั้งที่ 1).....	159
ฉ.4 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในตัวอย่างเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้น ของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที และ pH 9.5 โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ (ครั้งที่ 2).....	160
ฉ.5 โครมาโตแกรมของโปรตีนในตัวอย่างหนึ่งเป็ยก โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ในโตรเจน..	161

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เจลาติน (gelatin) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวครั้งแรกของคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่พบในกระดูก ผิวหนัง และ เอ็นจากสัตว์ ในสมัยโบราณ ได้มีการนำเอาเจลาตินมาใช้ในการทำอาหารเป็นเวลานานกว่า 6,000 ปีมาแล้ว เจลาตินนั้นมาจากภาษาละติน คือ gelatus ที่มีความหมายว่า แข็ง หรือ แน่น จากสถิติในตลาดโลกปริมาณการใช้เจลาตินมีมากถึง 110,000-140,000 ตันต่อปี (ปทุมพล และ มัชฌิมา ,2544) คิดเป็นมูลค่าเกินกว่า 400 ล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี และคาดว่าจะมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากปัจจุบันตลาดของผลิตภัณฑ์ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบกำลังขยายตัวอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในด้านอุตสาหกรรมอาหารซึ่งเป็นตลาดที่ใหญ่ที่สุดของเจลาติน ประมาณร้อยละ 55 รองลงมาคือ อุตสาหกรรมยา ประมาณร้อยละ 25 ของตลาดโลก นอกนั้นใช้ในอุตสาหกรรมถ่ายภาพร้อยละ 15 และอีกร้อยละ 5 ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เรียกว่า technical gelatin เช่น การทำกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ ลูกกลิ้งตัวพิมพ์ เป็นต้น (สุพัตรา และ อาพร , 2541) สำหรับประเทศไทยยังคงต้องสั่งซื้อเจลาตินจากต่างประเทศเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ จากสถิติข้อมูลของกรมศุลกากรตั้งแต่เดือนมกราคมปี 2541 จนถึงเดือนตุลาคม 2546 ประเทศไทยมีการนำเข้าเจลาตินเฉลี่ยประมาณ 1,250 ตันต่อปี คิดเป็นมูลค่าประมาณ 260 ล้านบาท ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะทำการสกัดเจลาตินจากเศษหนัง เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ และเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้จากหนังสัตว์เหล่านั้นด้วย

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่เป็นเศษหนังชั้นใน ที่ได้จากการขูดทิ้งเพื่อนำเอาหนังชั้นนอกเข้าสู่กระบวนการฟอกหนัง เนื่องจากหนังชั้นในนี้มีองค์ประกอบหลัก คือ โปรตีนที่มีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจน และเมื่อได้รับความร้อนคอลลาเจนจะสลายตัวได้เป็นเจลาติน ซึ่งกระบวนการสกัดเจลาตินแบบเดิมจะใช้วิธีทางเคมี โดยใช้กรดหรือด่างในการสกัด ทำให้เจลาตินที่ได้มีกลิ่นของกรดหรือด่างติดอยู่ แต่ในงานวิจัยจะใช้วิธีทางชีวภาพในการสกัดเจลาติน โดยเลือกใช้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรทีเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้าทำให้เจลาตินที่ได้ไม่มีกลิ่นของกรดหรือด่าง และไม่มี

สารเคมีปนเปื้อนอยู่ นอกจากนี้ยังเป็นการประหยัดทรัพยากรต่าง ๆ ที่จะต้องใช้ในการบำบัดของเสียที่เหลือจากกระบวนการสกัดเจลาตินด้วยสารเคมีอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเศษหนังเพื่อให้ได้เจลาติน

การสกัดเจลาตินจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ เวลา และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ใช้ในการสกัด

1.2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติของเจลาตินที่ได้จากการสกัดและภาวะที่ใช้ในการสกัด

เจลาตินที่ได้จากการสกัดที่สภาวะต่างกันจะมีสมบัติทางกายภาพที่สำคัญแตกต่างกันคือ ค่าความแข็งแรงของเจล และความหนืด ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติของเจลาตินที่ได้จากการสกัดและภาวะที่ใช้ในการสกัด เพื่อที่จะได้เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดให้ตรงตามสมบัติของเจลาตินที่ต้องการในการใช้งานต่อไป

1.2.3 ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินที่ได้จากการย่อยเศษหนังด้วยเอนไซม์ โดยใช้เจลฟิเลชันโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography)

เนื่องจากเจลาตินที่ได้จากการสลายตัวของคอลลาเจนจึงมีน้ำหนักรวมโมเลกุลค่อนข้างกว้างตั้งแต่หมื่นจนถึงแสนดัลตัน ดังนั้นในการทำบริสุทธิ์จึงเลือกใช้การแยกตามขนาดของโปรตีนเป็นหลัก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถเพิ่มมูลค่าของวัสดุที่มีมูลค่าต่ำให้มีมูลค่าสูงเพิ่มมากขึ้น โดยการสกัดเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ที่จะนำไปทิ้งหรือผลิตเป็นสินค้าที่มีมูลค่าต่ำ

1.3.2 ทราบสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการย่อยเศษแห้งด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้เอนจินที่มีสมบัติตามต้องการ และเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปปรับใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรมการผลิตเอนจินในเชิงการค้าต่อไป

1.3.3 ทำให้ได้เอนจินชนิดใหม่ ที่ได้จากการย่อยเศษแห้งด้วยเอนไซม์ และเป็นเอนจินที่มีกลิ่นดี ไม่มีกลิ่นของกรดหรือค่างหลงเหลืออยู่เหมือนกับการใช้วิธีการทางเคมี

1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ค้นคว้าข้อมูลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

- 1) ศึกษาชนิด สมบัติ และการทำงานของเอนไซม์
- 2) ศึกษาโครงสร้าง องค์ประกอบ และสมบัติของหนัง และเอนจิน
- 3) ศึกษาการสกัด และทำบริสุทธิ์พร้อมทั้งตรวจสอบสมบัติของโปรตีน
- 4) ศึกษาวิธีการตรวจสอบสมบัติของเอนจิน
- 5) ศึกษาวิธีประมวลผลเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับ

สมบัติของเอนจินที่ได้

1.4.2 ออกแบบการทดลอง เตรียมอุปกรณ์ และสารเคมี

1.4.3 การสกัดเอนจิน

- 1) การสกัดเอนจินจะใช้เศษหนังชั้นในที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอกหนัง และเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง คือ Commercial Alkaline protease มีชื่อทางการค้าว่า Savinase 12T
- 2) เลือกสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ เวลา และ pH ของบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการสกัด

1.4.4 นำสารละลายเอนจินที่ได้จากการสกัดมาทำให้แห้ง และทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้

นำเอนจินที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้การระเหยภายใต้สุญญากาศ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดโดยเลือกใช้ Lowry's method

1.4.5 การทำบริสุทธิ์ของเจลาตินโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี

ในงานวิจัยนี้เลือกการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่สกัดได้ โดยใช้เจลฟิลเตชันโครมาโตกราฟี เป็นการแยกสารโดยอาศัยขนาดของโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก และยังสามารถใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของสารได้อีกด้วย แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการทำบริสุทธิ์อีกครั้งเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เสียไปหลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี

1.4.6 ตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินโดยใช้ Native-PAGE และ SDS-PAGE โดยมีเจลาตินมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ

1.4.7 ทดลองแปรรูปสารละลายเจลาตินที่ได้เป็นเจลาตินผงและตรวจสอบสมบัติทางเคมีและกายภาพของเจลาติน

- 1) ความแข็งแรงของเจล หรือ Gel strength (Bloom strength)
- 2) ความหนืด หรือ Viscosity
- 3) การละลาย
- 4) pH
- 5) pI
- 6) สี (Color)
- 7) สารหนู ทองแดง สังกะสี ตะกั่ว และ โลหะหนัก (เทียบเป็นตะกั่ว)
- 8) ปริมาณความชื้น (Moisture content)
- 9) ปริมาณเถ้า (Ash Content)
- 10) ไขมัน (%Fat)
- 11) Microbiology test ทำการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

1.4.8 วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาตินผง

1.4.9 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

บทที่ 2

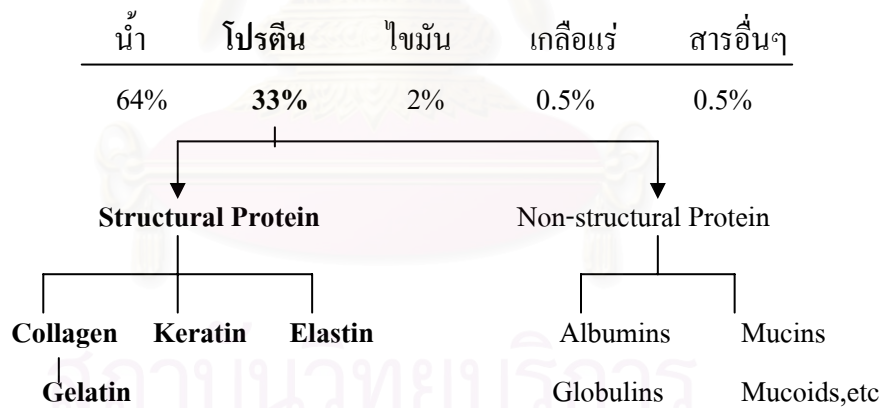
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 หนังสั้ว

2.1.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของหนัง

โดยทั่วไปหนังสั้วประกอบด้วย น้ำ 64% โปรตีน 33% ไขมัน 2% เกลือแร่ 0.5% และสารอื่นๆอีก 0.5% โดยองค์ประกอบของโปรตีนในหนังสั้วประมาณ 80-90% เป็นโปรตีนคอลลาเจน (collagen) เคอราติน (keratin) อีลาสติน (elastin) อัลบูมิน (albumin) โกลบูลิน (globulin) และ มูโคโปรตีน (mucoprotein) ซึ่งองค์ประกอบนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ด้วย (รูปที่ 2.1)



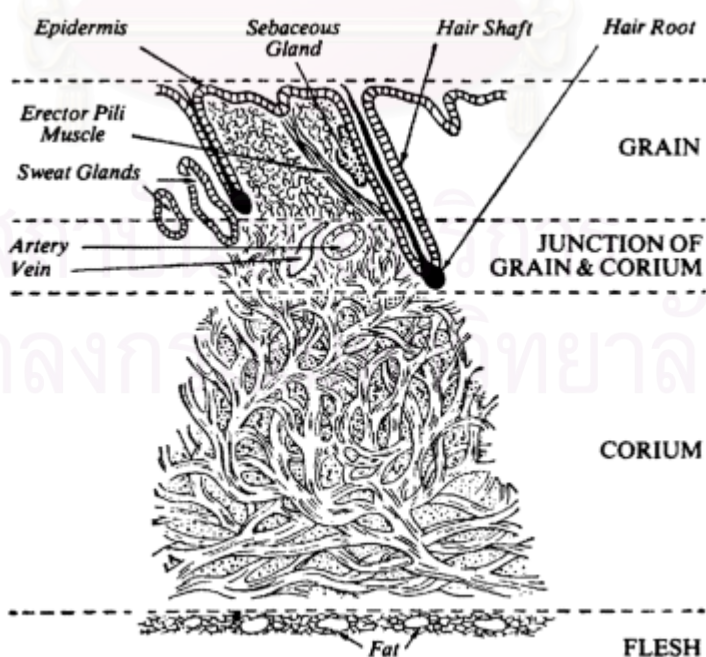
รูปที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบและปริมาณโดยเฉลี่ยของหนังสั้ว

โปรตีนคอลลาเจน (collagen) ในหนังสั้วจะเป็นคอลลาเจนชนิด I (type I) ประกอบด้วย โซโพลีเพปไทด์ชนิดควอนซัยสามโซมาพันกันเป็นโครงสร้างเกลียวสาม (triple helix structure) แบบวนขวา (right handed super helix) มีความแข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถคูดน้ำไว้ในโมเลกุลได้ ทำให้แผ่นหนังพองตัวขึ้น ถ้านำหนังสั้วไปต้มให้ความร้อน โมเลกุลของคอลลาเจนจะสลายตัวได้เป็นเจละติน (gelatin)

2.1.1.2 โครงสร้างของหนังสัตว์

หนังสัตว์มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

- 1) หนังชั้นบนสุด (epidermis) เป็นชั้นปกคลุมหนัง มีความหนาประมาณร้อยละ 0.5-2.0 ของความหนารวมของหนัง มีลักษณะเป็นเยื่อบางๆ ไม่มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยง สามารถกำจัดออกได้ในขั้นตอนการลงปูน
- 2) หนังชั้นกลาง (dermis or corium) มีความหนาประมาณร้อยละ 15 ของความหนารวมของหนัง หนังชั้นนี้จะเป็นส่วนประกอบหลักของหนังฟอก เป็นชั้นควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย มีองค์ประกอบที่สำคัญ เช่น โพรตีนเส้นใย (fiber protein) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ต่อมเหงื่อ เส้นประสาท เส้นเลือด เป็นต้น เมื่อตัดดูตามขวาง (cross section) จะพบเส้นใยขนาดต่างๆกันสานกันอยู่ หนังชั้นนี้ยังแบ่งได้เป็น 2 ชั้นคือ ชั้นบน (papillary layer) ประกอบด้วยเส้นใยเล็กสานกันอยู่อย่างหนาแน่น และชั้นล่าง (reticular layer) เป็นเส้นใยที่หยาบกว่าและสานกันอยู่อย่างหลวมๆ เมื่อนำมาผ่า (split) จะสามารถแยกออกได้เป็น 2 ส่วน คือ upper split และ lower split
- 3) หนังชั้นล่างสุด (subcutaneous or hypodermis) ประกอบด้วยไขมันและพังพืด ถูกกำจัดออกด้วยเครื่องถากหนัง



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของหนังสัตว์ (Sharphuse, 1989)

2.1.1.3 ประเภทของหนังสัตว์

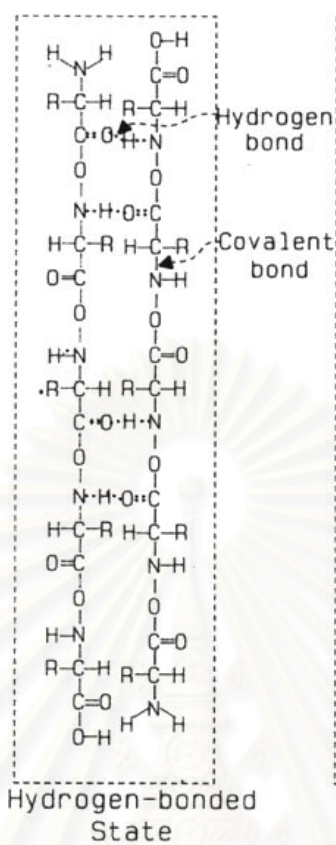
หนังสัตว์สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ

- 1) หนังสัตว์ใหญ่ (hides) เช่น หนังโค หนังกระบือ หนังม้า
- 1) หนังสัตว์เล็ก (skins) เช่น หนังลูกโค หนังแพะ หนังแกะ หนังสุกร หนังกระต่าย
- 3) หนังสัตว์เลื้อยคลาน เช่น หนังงู หนังจระเข้

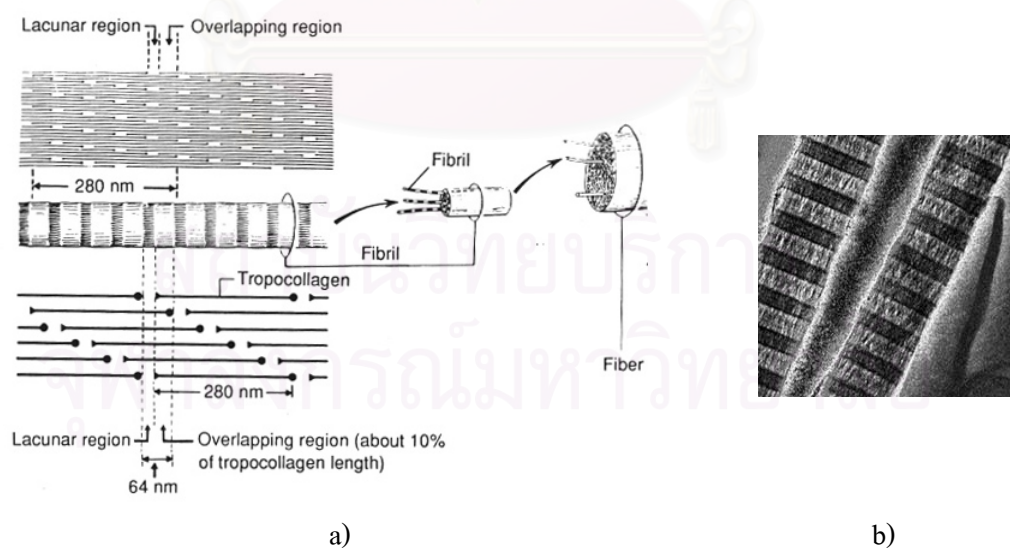
2.1.2 เจลละติน (Gelatin)

เจลละตินเป็นสารอินทรีย์เคมีชนิดหนึ่งที่เป็นไฮโดรคอลลอยด์ของโปรตีนที่ใช้เป็นอาหาร ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เกาะเกี่ยวพันกันอยู่ด้วยพันธะเพปไทด์ เจลละตินได้มาจากการสลายตัวครั้งแรกของคอลลาเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่พบได้ในเอ็น ผิวหนัง กระดูก เข่า กีบ จากสัตว์

หน่วยย่อยของโครงสร้างคอลลาเจน คือ โทรโปคอลลาเจน (tropocollagen) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีรูปทรงกระบอก ยาวประมาณ 2,800 อังสตรอม (Å) และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 14-15 อังสตรอม (Å) ประกอบด้วยสายโซ่โพลีเพปไทด์ชนิดวนซ้าย 3 โซ่ (ใน 3 โซ่นี้มี 2 โซ่เหมือนกัน) มาพันขนานกัน มีโครงสร้างเกลียวสาม (triple helix structure) แบบขวามือ (right handed super helix) ซึ่งแต่ละโมเลกุลถูกเชื่อมขวางกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) และระหว่างโมเลกุลถูกเชื่อมขวางกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) (รูปที่ 2.3) สายของโพลีเพปไทด์ในโทรโปคอลลาเจนนี้มี 2 ชนิดเรียกว่า ชนิดที่ 1 และ 2 ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน โดยที่แต่ละสายของโพลีเพปไทด์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000 ดัลตัน เมื่อรวมกันจะเกิดเป็นโมเลกุลของโทรโปคอลลาเจน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300,000 ดัลตัน โพลีเพปไทด์ในโทรโปคอลลาเจนนี้มีโครงสร้างแบบเฮลิคซ์ ซึ่งแตกต่างไปจากแอลฟา - เฮลิคซ์ (α - helix) ทั่วไป เพราะในคอลลาเจนมีกรดอะมิโนโพรลีน (proline) อยู่ในปริมาณมาก ทำให้ไม่สามารถเกิดเป็นแอลฟา - เฮลิคซ์ได้ โมเลกุลของโทรโปคอลลาเจนจะเชื่อมกันปลายต่อปลาย และอยู่ติดกันเกิดเป็นคอลลาเจนไฟบริล (collagen fibril) โดยแต่ละโมเลกุลของโทรโปคอลลาเจนจะวางเหลื่อมกับโทรโปคอลลาเจนอีกโมเลกุลหนึ่งที่อยู่ข้างเคียง และประมาณหนึ่งในสี่ของความยาวทำให้เกิดเป็นสายขวางบนเส้นใยคอลลาเจน (Francis A. Carey, 1992 และ รัชนี, 2535) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.3 พันธะโควาเลนต์ และ พันธะไฮโดรเจน ของเจละติน



รูปที่ 2.4 a) แสดงการวางตัวของโมเลกุลโทรโปคอลลาเจนไฟบริล

b) ภาพแสดงคอลลาเจนไฟบริล

2.1.2.1 องค์ประกอบของเจลาติน

เจลาตินประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายหมู่ที่เชื่อมกันอยู่ด้วยพันธะเพปไทด์ เมื่อนำเจลาตินมาทำการไฮโดรไลซ์อย่างสมบูรณ์ พบว่าองค์ประกอบหลักของเจลาตินประกอบด้วย ไกลซีน (glycine) ร้อยละ 27 อะลานีน (alanine) ร้อยละ 9 โพลีนและไฮดรอกซีโพลีน (proline and hydroxyproline) ร้อยละ 25 อาร์จินีน (arginine) ร้อยละ 8 กรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) ร้อยละ 6 กรดกลูตามิก (glutamic acid) ร้อยละ 10 และ กรดอะมิโนอื่น ๆ ร้อยละ 15 (ตารางที่ 2.1)

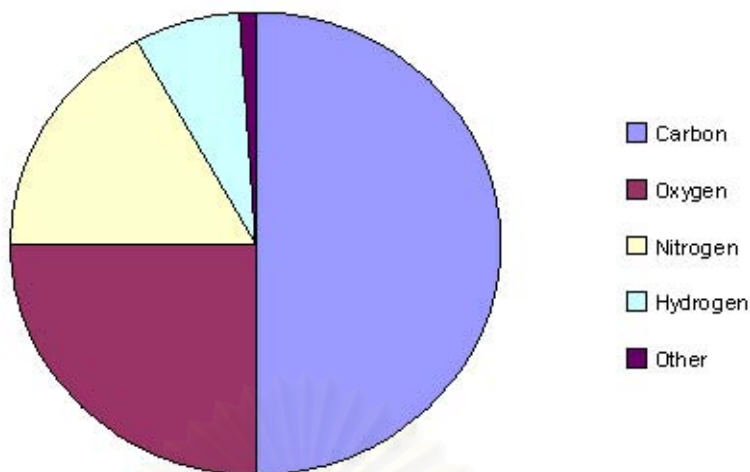
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของเจลาติน (ปฐมพล และ มัณฑนา , 2544)

กรดอะมิโน	%โดยน้ำหนัก	กรดอะมิโน	%โดยน้ำหนัก
Alanine	11.0	Methionine *	0.9
Arginine	8.8	Phenylalanine	2.2
Aspartic acid	6.7	Proline	16.4
Glutamic acid	11.4	Serine	4.2
Glycine	27.5	Threonine **	2.2
Histidine	0.78	Tyrosine	9.3
Leucine&Isoleucine	5.1	Valine	2.6
Lysine	4.5	Cystline	trace

* กรดอะมิโนจำเป็น ที่ถูกทำลายได้โดยการออกซิเดชัน

** กรดอะมิโนจำเป็น ที่ถูกทำลายได้ง่ายโดยการไฮโดรไลซ์ และสูญเสียไปในการผลิตเจลาติน

การวิเคราะห์ในรูปของธาตุที่เป็นองค์ประกอบในเจลาตินพบว่า มีองค์ประกอบคือ คาร์บอน = 50% ออกซิเจน = 25% ไนโตรเจน = 17% และไฮโดรเจน = 7% ของปริมาณธาตุทั้งหมดในเจลาติน (รูปที่ 2.5)



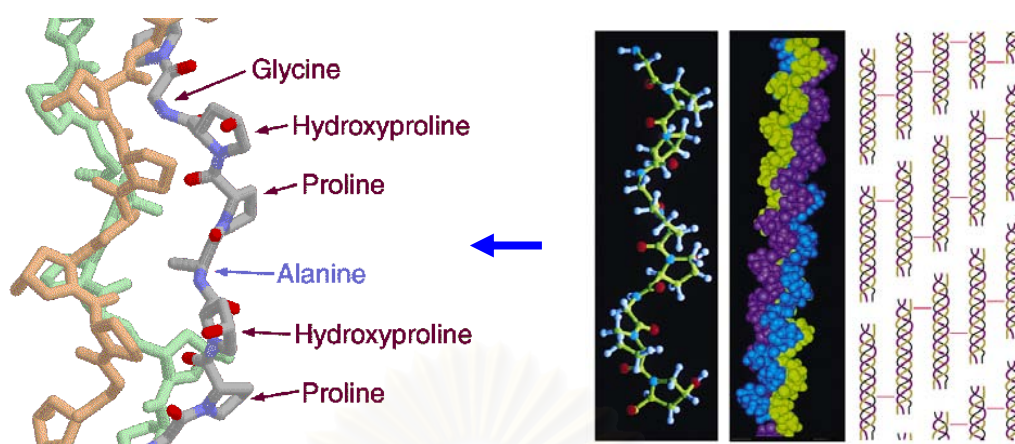
รูปที่ 2.5 ปริมาณแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ที่พบในเจลาติน

2.1.2.2 โครงสร้างของเจลาติน

เนื่องจากเจลาตินเป็นผลผลิตที่ได้จากการสลายตัวของคอลลาเจนดังกล่าวมาแล้ว ดังนั้น โครงสร้างของเจลาตินจึงมีลักษณะเหมือนกับคอลลาเจนแต่มีสายของโพลีเพปไทด์ (polypeptide chain) ที่สั้นกว่า การเปลี่ยนจากคอลลาเจนเป็นเจลาตินสามารถทำได้โดยใช้กรดต่าง เอนไซม์ ความเย็น ความร้อน ซึ่งจะทำให้สายโซ่โมเลกุลคอลลาเจนแตกออกสั้นลง และสลายตัวเป็นเจลาตินที่ช่วงน้ำหนักโมเลกุลกว้างมากตั้งแต่ 2,000 จนถึงหลายแสนอะตอม (บุญรัตน์ และ นงนุช , 2533)



รูปที่ 2.6 การเปลี่ยนแปลงจากคอลลาเจนเป็นเจลาติน (Shreve R. N., 1967)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเจลาติน

2.1.2.3 ประเภทของเจลาติน

เจลาตินแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

- 1) Type A ผลิตโดยใช้ acid process มีค่า Isoelectric point อยู่ในช่วง 7-9
- 2) Type B ผลิตโดยใช้ alkali หรือ lime process มีค่า Isoelectric point อยู่ในช่วง

4.6-5.2

2.1.2.4 การสกัดเจลาติน

1) Liming Process วิธีนี้นิยมใช้กับวัตถุดิบที่เป็นพวกกระดูก เขา และหนังจากหนังสัตว์ใหญ่ เช่น โคและกระบือ สารละลายของด่างที่ใช้ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ $[Ca(OH)_2]$ การ liming จะช่วยให้การเปลี่ยนจากคอลลาเจนไปเป็นเจลาตินเกิดได้ง่ายขึ้น และช่วยกำจัดพวกโปรตีนที่ละลายน้ำออกได้อีกด้วย เช่น อัลบูมิน (albumin) มูซิน (mucin) ซึ่งมีผลต่อความใสของเจลาติน และยังช่วยทำให้เจลาตินที่สกัดได้มี ค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength) สูงขึ้นด้วย

วัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการ Liming แล้วจะถูกนำมาสกัดเจลาติน โดยใช้น้ำที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 55-100 องศาเซลเซียส (Loeven, 1954) เพราะถ้าใช้อุณหภูมิในการสกัดสูงเกินไปเจลาตินที่ได้จะมีคุณภาพต่ำ สารละลายของเจลาตินที่สกัดได้จะนำไปผ่านการฟอกสีก่อน แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสเพื่อลดความชื้น

2) Acid Process วิธีนี้นิยมใช้กับวัตถุดิบจำพวกหนังหมู กรดที่นิยมใช้ได้แก่ HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ และ H₂SO₃ การแช่หนังในกรดนี้จะช่วยเปลี่ยนคอลลาเจนไปเป็นเจละตินได้ง่ายขึ้น และช่วยกำจัดพวกโปรตีนที่ละลายน้ำออกได้อีกด้วย เช่น อัลบูมิน (albumin) มูซิน (mucin) ซึ่งมีผลต่อความใสของเจละติน และยังช่วยทำให้เจละตินที่สกัดได้มี ค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength) สูงขึ้นด้วย หลังจากกระบวนการย่อย เจละตินจะถูกสกัดด้วยน้ำเช่นเดียวกับ Liming Process

3) Enzyme Process วิธีนี้เป็นวิธีการใหม่ที่จะนำมาใช้ในการย่อยหนัง โดยการใช้ Proteolytic enzyme มาทำการย่อยพันธะเพปไทด์ของสายโปรตีนทำให้ได้สายของโปรตีนที่ขนาดสั้นลง จึงทำให้เจละตินที่ได้มีขนาดเล็กลงและสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งข้อดีของการใช้เอนไซม์นี้ คือ ทำให้ได้เจละตินที่มีกลิ่นที่ดีไม่มีกลิ่นของกรดหรือต่างหลงเหลืออยู่เหมือนกับ 2 วิธีแรก

2.1.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเจละติน

- 1) วัตถุดิบจากโรงงาน
- 2) ขนาดของอนุภาคในเจละติน
- 3) ความเข้มข้นของเจละตินที่ต้องการ
- 4) เวลาที่ใช้
- 5) เครื่องมือ และ วิธีการที่ใช้
- 6) ความหนืดที่ไม่เท่ากันของเจละตินแต่ละชนิด

2.1.2.6 สมบัติของเจละติน

โดยทั่วไปเจละตินทางการค้า จะมีลักษณะเป็นเม็ดหยาบจนถึงเป็นผงละเอียด ไม่มีรส ไม่มีกลิ่น สีจะใสเหมือนแก้ว มีค่าความชื้นประมาณ 9-12% ค่าความถ่วงจำเพาะ 1.3-1.4 ซึ่งสมบัติของเจละตินขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ (Kirk-Othmer, 1978)

- 1) ประเภทและแหล่งของเจละติน
- 2) วิธีการผลิต
- 3) สภาวะที่ใช้ในการสกัดและความเข้มข้นของ กรด ต่าง หรือเอนไซม์ ที่ใช้ในการสกัด

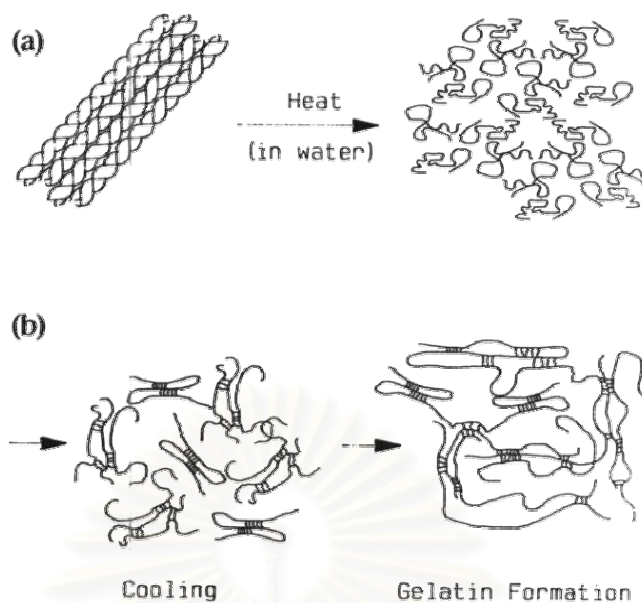
- 4) อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด
- 5) ความเป็นกรด-ด่าง
- 6) สมบัติทางเคมีของสารที่ปนเปื้อน (impurities) หรือที่เติมลงไป (additives)

สมบัติทางด้านกายภาพ และเคมีของเจลาติน มีดังนี้

1) การเกิดเจล (Gelation)

สมบัติที่สำคัญของเจลาตินในการนำมาใช้ในงานด้านต่าง ๆ คือ การที่เจลาตินสามารถกลับมารวมตัวเป็นเจลขึ้นใหม่ได้หลังจากผ่านการให้ความร้อน เมื่อนำสารละลายเจลาตินที่มีความเข้มข้นมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ มาทำให้มีอุณหภูมิเย็นลงจนถึงประมาณ 35-40 องศาเซลเซียส ชั้นแรกค่าความหนืดของเจลาตินจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นและอยู่ในรูปของเจล ในกระบวนการขึ้นรูปของเจลมีสามขั้นตอนคือ ขั้นแรกจะเกิดการจัดเรียงตัวของห่วงโซ่โพลีเมอร์ที่อยู่อย่างโดดเดี่ยวให้กลับมามีลักษณะการจัดลำดับในรูปของเกลียวหรือโครงสร้างของคอลลาเจน ขั้นที่สอง จะเกิดการเชื่อมต่อของเจล โดยสองหรือสามส่วนจะทำให้เกิดโครงสร้างแบบผลึก (crystallites) และขั้นตอนที่สามโครงสร้างจะมีความคงตัวโดยพันธะของไฮโดรเจน ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างบริเวณเกลียว (helical regions) โครงสร้างที่เกิดการแข็งตัวหรือเปลี่ยนสภาพเป็นเจล จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเจลาติน ความบริสุทธิ์ของตัวอย่างเจลาติน ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และสารที่เติมลงไปในการเจลาติน

เนื่องจากมูลค่าของเจลาตินจะขึ้นอยู่กับค่าความแข็งแรงของเจล ดังนั้นกระบวนการคิดคำนวณหาความแข็งแรงของเจลจึงมีความสำคัญมาก ในทางการค้าค่าความแข็งแรงของเจลาตินคำนวณได้จากการทดสอบมาตรฐานด้วยการวัดแรงที่กดลงไปบนผิวของเจลให้มีความลึก 4 มิลลิเมตร โดยใช้หัววัดที่มีหน้าตัดแบบราบเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.7 มิลลิเมตร โดยแรงที่กดลงบนเจลจะมีเป็นหน่วยกรัม ซึ่งจะอยู่ในรูปของ g Bloom โดยอุณหภูมิที่เป็นจุดเปลี่ยนสำหรับการวัดหาการเซตตัว (setting point) ของเจลาติน ได้แก่ การเปลี่ยนสภาพจากคอลลอยด์เป็นเจล (sol to gel) หรือจุดหลอมละลาย เจลาตินในทางการค้าจะมีจุดหลอมละลายระหว่าง 23 ถึง 30 องศาเซลเซียส โดยค่าอุณหภูมิที่เกิดการเซตตัวของเจลาตินจะมีค่าประมาณ 2 ถึง 5 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.8 แสดงการเกิดเจลของเจลาติน (Linus Pauling, Robert B. Corey, and H. R. Branson, 1951)

- a) แสดงโครงสร้างของเจลาตินเมื่อมีการให้ความร้อน
- b) แสดงการเกิดเจลของเจลาตินเมื่อทำให้อุณหภูมิเย็นลง

2) การละลาย (Solubility)

เจลาตินจะไม่ละลายใน แอลกอฮอล์ อะซิโตน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ อีเทอร์ เบนซีน ปีโตรเลียมอีเทอร์ และ ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วอื่น ๆ แต่ละลายได้ใน น้ำ กรดอะซิติก สารละลายเจือจางของ polyhydric alcohol เช่น กลีเซอรอล เซอร์บีทอล โพรพิลีนไกลคอล และ แมนนิทอล เมื่อเจลาตินละลายน้ำจะดูดน้ำเข้าไปในโมเลกุล และพองตัว การดูดน้ำของเจลาตินจะขึ้นปฏิกิริยาคายความร้อน ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยการลดอุณหภูมิลง และที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำ ๆ เมื่อมีการเติม ฟอสเฟต ซิเตรต หรือ ซัลเฟต ในสารละลายเจลาติน จะช่วยทำให้ความสามารถในการละลายดีขึ้น แต่ถ้าความเข้มข้นของเกลือสูงเกินไปจะทำให้เจลาตินตกตะกอน (Mrak และ Stewart, 1957 และ Kirk -Othmer, 1966,1978) เมื่อเม็ดเจลาตินดูดน้ำเข้าไปในโมเลกุล และพองตัวออก แรงเกาะระหว่างโมเลกุลจะน้อยลงและเปลี่ยนจากลักษณะแข็งเปราะ เป็นอ่อนนุ่มยืดหยุ่น

3) เสถียรภาพ (Stability)

เสถียรภาพของเจลละตินขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ electrolysis และค่าความเป็นกรด-ด่าง เจลละตินแห้งที่เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้องจะมีอายุการเก็บหลายปี แต่สามารถสลายตัวได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส และจะเกิดการสันดาปอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 500 องศาเซลเซียส สารละลายหรือเจลของเจลดินจะเป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และไวต่อการสลายตัวด้วยเอนไซม์ (proteolytic enzyme) (Mrak และ Stewart, 1957 และ Kirk -Othmer, 1966,1978)

4) ความแข็งแรงของเจล (Gel strength)

เป็นการทดสอบคุณภาพของเจลดินที่สำคัญอันหนึ่ง ซึ่งค่าความแข็งแรงของเจล คือ ค่าแรงที่ใช้ในการกดผิวหน้าของเจลดินให้ลึกลงไป 4 มิลลิเมตร โดยเจลที่ใช้เตรียมสารละลายเจลดินมีความเข้มข้นร้อยละ 6.67 (โดยน้ำหนัก) แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ค่าแรงที่ได้มีหน่วยเป็นกรัม วัดโดยใช้เครื่อง Bloom gelometer หรือ texture analysis เจลดินทางการค้ามีค่า bloom strength ประมาณ 50-300 กรัม

5) ความหนืด (Viscosity)

เป็นคุณสมบัติที่สำคัญรองจาก Gel strength ค่าความหนืดของเจลดินจะแปรผกผันกับ อุณหภูมิ และ pH แต่จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารละลายเจลดิน ค่าความหนืดที่วัดได้จากสารละลายเจลดินที่ความเข้มข้น 6.67% (โดยน้ำหนัก) วัดโดยใช้เครื่อง U tube viscosmeter อุณหภูมิ 60°C ค่าความหนืดที่วัดได้มีหน่วยเป็น millipoise (mps) โดยทั่วไปเจลดินมีความหนืดประมาณ 15-70 mps

6) การพองตัว (Swelling)

เมื่อนำเจลดินมาแช่น้ำจะสามารถดูดซับน้ำได้ถึง 10 เท่าของน้ำหนักเจลดินแล้วจะเกิดการพองตัว และมีความยืดหยุ่นซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นยกกำลังสอง และจำนวนการเชื่อมขวาง (cross-links) การพองตัวจะทำให้จำนวนการเชื่อมขวางลดลง และจะมีการเชื่อมขวางน้อยที่สุดที่ Isoelectric point อย่างไรก็ตามที่ pH ของสารละลายเจลดินต่ำกว่า Isoelectric point การเลือกชนิดของ anions สามารถควบคุมการพองตัวได้ แต่ที่ pH สูงกว่า

Isoelectric point การเลือกชนิดของ cations สามารถควบคุมการพองตัวได้เช่นกัน โดยไอออนเหล่านี้จะไปทำให้ H-bond แตกออก ทำให้การพองตัวของเจลละตินเพิ่มขึ้น (Mrak และ Stewart, 1957 และ Kirk -Othmer, 1966,1978)

7) สี (Color)

สีของเจลละตินจะขึ้นอยู่กับชนิด และ คุณภาพ ของวัตถุดิบ รวมทั้งจำนวนครั้งที่ทำการสกัด โดยทั่วไปเจลละตินที่สกัดจากหนังหมูจะมีสีที่อ่อนกว่าเจลละตินที่ได้จากกระดูกสัตว์ อย่างไรก็ตามพบว่าสมบัติของเจลละตินไม่ขึ้นอยู่กับสี

8) ความขุ่น

ความขุ่นของสารละลายเจลละตินอาจเกิดจากการปนเปื้อนของสารที่ไม่ละลายน้ำที่มาจากขั้นตอนการสกัด การเติมเกลือ (Neutral Salt) จะช่วยรักษาความใส ความหนืด และความแข็งแรงของเจล (Gel strength) ให้คงที่ นอกจากนี้ ความขุ่นยังขึ้นกับสัดส่วนของส่วนผสมในสารละลายและ pH อีกด้วย

9) Amphoteric Character

คุณสมบัติ Amphoteric ของเจลละตินเกิดขึ้นเนื่องจากหมู่ที่ทำหน้าที่ (functional group) ของ กรดอะมิโน, กรดอะมิโนที่อยู่ปลายสาย (terminal amino acid) และ หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ที่เกิดขึ้นขณะทำการย่อย (hydrolysis) สามารถวัดการกระจายของ functional group เหล่านี้ และ Isoelectric point ได้โดยใช้ mixed-bed ion exchange resin ซึ่งค่าที่ได้จะอยู่ในรูปของ pH Units นอกจากนี้สมบัติ Amphoteric และ Isoelectric point ของเจลละติน Type A จะขึ้นกับเวลาที่ใช้ในกระบวนการสกัดด้วย (acid process) ส่วนเจลละติน Type B จะขึ้นกับการกวนในการสกัดเจลละติน (lime process) อย่างไรก็ตามค่า Isoelectric point ของเจลละตินจะขึ้นกับปริมาณเกลือที่มีอยู่ด้วย (Mrak และ Stewart, 1957 และ Kirk -Othmer, 1966,1978)

2.1.1.7 ประโยชน์ของเจลละติน

เจลละตินถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ มากมาย ตัวอย่างของการนำเจลละตินมาใช้ในอุตสาหกรรมมีดังนี้

1) อุตสาหกรรมอาหาร

ในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำเจลาตินมาใช้ประโยชน์ดังนี้

- ก. ใช้ผลิตเยลลี่ (gelling agent)
- ข. ใช้เป็นภาชนะห่อหุ้ม (film former) ในการเคลือบผลไม้, ไม้กวาด, เนื้อสัตว์ เป็นต้น
- ค. ใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืด (thickener) ในอาหารประเภทแยม, น้ำเชื่อม, ชุป เป็นต้น
- ง. ใช้เป็นสารให้ความคงตัว (stabilizer) ในไอศกรีม, โยเกิร์ต, ครีมชีส เป็นต้น
- จ. เป็นสารช่วยให้ความคงตัว (protective colloid) ในขนมอบ
- ฉ. ใช้เป็น emulsifier ในเนื้อสัตว์, ไม้กวาด, ครีมชุป เป็นต้น
- ช. ทำให้น้ำผลไม้ เบียร์ ไวน์มีความใส (beverage fining agent)

โดยทั่วไปเจลาตินที่นำมาใช้งานในอุตสาหกรรมอาหารจะมีสมบัติที่สำคัญ ดังนี้

ตารางที่ 2.2 แสดงสมบัติที่สำคัญของเจลาตินที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

สมบัติของเจลาติน	ชนิด A	ชนิด B
pH	3.8 - 5.5	5.0 - 7.5
pI (Isoelectric point)	7.0 - 9.0	4.7 - 5.4
ค่าความแข็งแรงของเจล (Bloom)	50 - 300	50 - 300
ความหนืด (mps)	15 - 75	20 - 75
เถ้า	0.3 - 2.0	0.5 - 2.0

ตารางที่ 2.3 แสดงตัวอย่างปริมาณและค่าความแข็งแรงของเจลในเจลละตินที่ใช้เป็นส่วนประกอบ
ในอุตสาหกรรมอาหาร

ประเภทของอุตสาหกรรมอาหาร	ปริมาณที่ใช้ (%)	เจลละติน (Bloom)
ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับนม	0.2 - 1.0	150 - 250
อาหารแช่แข็ง	0.1 - 0.5	225 - 250
ผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลไม้และของหวาน	7.0 - 9.0	175 - 275
กัมมี่ แบร์ (Gummi bears)	7.0 - 9.0	200 - 275
มาร์ชเมลโลว์ (Marshmallows)	1.7 - 2.5	225 - 275
เซอร์กัสนัท (Circus Peanuts)	2.0 - 2.5	225 - 250
ลูกกวาด	0.5 - 1.0	50 - 100
วาฟเฟิล (Wafers)	0.5 - 1.0	50 - 100
ไส้ของขนมปัง และ Icings	1.0 - 2.0	225 - 250
ผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์	1.0 - 5.0	175 - 275
ไวน์, เบียร์ และ น้ำผลไม้	0.002 - 0.015	100 - 200

2) อุตสาหกรรมยา

ในอุตสาหกรรมยามีการนำเจลละตินมาใช้ดังนี้

ก. ใช้ผลิตแคปซูลยา

- แคปซูลชนิดแข็ง จะผลิตจากกระบวนการจุ่มใช้เจลละตินเป็นส่วนประกอบในการผลิตแคปซูลประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์
- แคปซูลชนิดอ่อน จะผลิตจากกระบวนการหมุนแห้งใช้เจลละตินเป็นส่วนประกอบ ในการผลิตแคปซูลประมาณ 40-45 เปอร์เซ็นต์

ข. ใช้เป็นตัวประสานในเม็ดยา

ค. ใช้เป็นสารช่วยกระจายตัว (Emulsifier) ในน้ำมันตับปลาที่มีการเติมวิตามิน

ง. ใช้เป็นพาหนะ (Vehicle) ในการควบคุมการส่งผ่านเม็ดยา

- จ. ใช้ในการผ่าตัด sterile sponge โดยจะเป็นตัวดูดซับเลือดในขณะที่ทำการรักษา ซึ่งจะสามารถที่ไว้ในร่างกายได้ เพราะสามารถสลายได้ด้วยเอนไซม์ ของร่างกาย
- ฉ. ใช้เป็นสารเพิ่มเสถียรภาพ (Stabilizer) ในน้ำมันที่มีคุณค่าต่าง ๆ

ตารางที่ 2.4 แสดงสมบัติที่สำคัญของเจลาตินที่นำมาใช้ในการผลิตแคปซูลยาชนิดแข็ง

สมบัติของเจลาติน	ชนิด A	ชนิด B
ค่าความแข็งแรงของเจล (Bloom)	240 - 300	200 - 250
ความหนืด (mp)	44 - 55	45 - 60
pH	4.5 - 5.5	5.3 - 6.5
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้ออกซิเจน	<1000/กรัม	<1000/กรัม
E. coli	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
แซลโมเนลลา (Salmonella)	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ

ตารางที่ 2.5 แสดงสมบัติที่สำคัญของเจลาตินที่นำมาใช้ในการผลิตแคปซูลยาชนิดอ่อน

สมบัติของเจลาติน	ชนิด A	ชนิด B
ค่าความแข็งแรงของเจล (Bloom)	150 - 200	125 - 175
ความหนืด (mp)	25 - 35	30 - 45
pH	4.5 - 5.5	5.3 - 6.5
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้ออกซิเจน	<1000/กรัม	<1000/กรัม
E. coli	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
แซลโมเนลลา (Salmonella)	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ

ตารางที่ 2.6 แสดงสมบัติที่สำคัญของเจระดินที่นำมาใช้ในการผลิตยาเม็ด

สมบัติของเจระดิน	ชนิด A	ชนิด B
ค่าความแข็งแรงของเจล (Bloom)	75 - 150	75 - 150
ความหนืด (mp)	17 - 35	20 - 35
pH	4.5 - 5.5	5.3 - 6.5
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้ออกซิเจน	<1000/กรัม	<1000/กรัม
E. coli	ต้อง ไม่พบ	ต้อง ไม่พบ
แซลโมเนลลา (Salmonella)	ต้อง ไม่พบ	ต้อง ไม่พบ

3) อุตสาหกรรมถ่ายภาพ

ในอุตสาหกรรมถ่ายภาพมีการนำเจระดินมาใช้ประโยชน์ดังนี้

ก. ใช้เป็นองค์ประกอบสำคัญของ silver halide photographic film

ข. ใช้เป็นตัวนำสี และจะช่วยทำหน้าที่ยึดเกาะ

โดยยึดอนุภาคของผงสีและพื้นผิวให้เกาะไว้ด้วยกัน เพราะเจระดินมีลักษณะโปร่งใส ไม่มีสี ทนทานต่อการขัดถูยึดหยุ่นได้ ทำให้ผงสีติดกับฟิล์มได้นานขึ้น

ตารางที่ 2.7 แสดงสมบัติที่สำคัญของเจระดินที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมภาพถ่าย

สมบัติของเจระดิน	ช่วงที่เลือกใช้
ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	10.5 - 13.0
pH*	5.65 - 5.85
ความหนืด* (mp)	74.0 - 95.0
ค่าความแข็งแรงของเจล (g Bloom)	250 - 310
ค่าการดูดกลืนแสง*	
- 420 นาโนเมตร	0.0 - 0.158
- 650 นาโนเมตร	0.0 - 0.032
ความหนืดที่สูญเสียไป** (เปอร์เซ็นต์)	< 5 %

* วัดที่ความเข้มข้นของเจละดินเท่ากับ 6.16 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

** วัดที่ความเข้มข้นของเจละดินเท่ากับ 10.0 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการวัดไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4) อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

จะมีการเติมเจละดินลงไปเพื่อเพิ่มความเหนียวข้น และเพิ่มผิวสัมผัสที่ให้แก่เนื้อครีมในเครื่องสำอาง และเจละดินยังช่วยในการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอให้ผิวไม่เหี่ยวย่น นุ่มชุ่มชื้น เพราะเจละดินเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยโปรตีน

5) ด้านอื่น ๆ

นอกจากนี้ยังมีการนำเจละดินมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น

ก. ใช้เจละดินเป็นองค์ประกอบในการผลิตท่อ PVC

ข. ใช้เจละดินในการผลิตกระดาษไร้คาร์บอนที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาและพัฒนากระบวนการเพื่อให้ได้มาซึ่งโปรตีนคอลลาเจนหรือเจละดินจากเศษหนัง ในช่วงแรกนิยมใช้กรดหรือด่างในกระบวนการสกัด ต่อมาเริ่มนิยมนำเอนไซม์มาใช้ในการสกัดด้วย จากศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโปรตีนในเศษหนังจากขั้นตอนการชุบหนัง โดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรทีเอส เพื่อการนำโครเมียมและโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ โดยการแปรผันปริมาณปูนขาว เอนไซม์ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ พบว่า การใช้ปูนขาว 5-6% และเอนไซม์อัลคาไลน์โปรทีเอส 6% ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที สามารถย่อยโปรตีนในเศษหนังออกมาได้ถึง 76% ต่อจากนั้นทำการกรองเพื่อแยกตะกอนโครเมียมออกจากไฮโดรไลเซตโปรตีน พบว่าไฮโดรไลเซตโปรตีนที่ได้มีโครเมียมอยู่น้อยกว่า 4.5 ppm (Taylor และคณะ, 1990) หลังจากนั้นมีการศึกษาถึงการย่อยโปรตีนในเศษหนังด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรทีเอส โดยการเตรียมตัวอย่างเศษหนังในน้ำที่มากพอ อุณหภูมิ 60-85 องศาเซลเซียส แล้วเติมเกลืออัล

คาไลน์เอิร์ธ และ/หรือ เกลืออัลคาไลน์ เพื่อปรับ pH ให้อยู่ในช่วง pH 8-12 และเติมเอนไซม์ Alkalase 3% โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นแยกไฮโดรไลเซตโปรตีนที่ได้ออกมา พบว่าไฮโดรไลเซตโปรตีนที่ได้มีโครเมียมอยู่น้อยกว่า 1 ppm และไม่มีการเปลี่ยนสัดส่วนของกรดอะมิโนเมื่อเทียบกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน (Taylor และคณะ , 1992) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาถึงกระบวนการใช้เอนไซม์กับเศษหนัง หรือ วัตถุดิบที่มีโครเมียมปนอยู่ด้วย (Taylor และคณะ , 1992) โดยในการทดลองต้องมีการเติมน้ำประมาณ 75-95% ของส่วนผสมทั้งหมดลงไป แล้วเติมด่างเพื่อปรับ pH และแคลเซียมหรือแมกนีเซียมเพื่อใช้เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-75 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการทดลอง คือ ครึ่งชั่วโมงจนถึง 4 ชั่วโมง โดยจะใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่น้อยที่สุดที่สามารถย่อยโปรตีนออกมาได้มากที่สุด ดังนั้นในกระบวนการผลิตจะทำให้ได้ไฮโดรไลเซตโปรตีนที่ละลายอยู่ในน้ำและโครเมียมที่ไม่ละลายน้ำ ต่อจากนั้นทำการแยกส่วนที่ละลายน้ำกับส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกจากกัน ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะมีโครเมียมเหลืออยู่ซึ่งอาจนำกลับมาใช้ใหม่ได้ในขั้นตอนของการดองกรดและการฟอกโครม และที่สำคัญที่สุดไฮโดรไลเซตโปรตีนที่ได้จะไม่มีการปนเปื้อนโครเมียมหลงเหลืออยู่ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ปุ๋ย และเครื่องสำอาง กระบวนการดังกล่าวข้างต้นถือเป็นความก้าวหน้าสำหรับการจัดการกับของเสียที่เกิดขึ้นจากอุตสาหกรรมฟอกหนัง ตัวอย่างของเสียที่นำมาใช้สกัดโปรตีนได้แก่ หนังที่ผ่านการฟอกโครมแล้ว หนังฟอกที่ผ่านการเจียร โครมเล็ก โครมสลัด

P.G. Dalev และ L.S. Simeonova (1992) ได้ศึกษาถึงการใช้อินไซม์ในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อสกัดแยกโปรตีนและไขมันออกจากเศษหนังที่ได้จากการผ่าแยกชั้น โดยใช้เอนไซม์ Alkaline proteinase จาก *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 50,000 UI/g ที่อุณหภูมิ 55-66 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ปริมาณโปรตีน 35-45% และปริมาณไขมัน 4-8% โดยโปรตีนที่สกัดได้ส่วนมากเป็นคอลลาเจนซึ่งนำไปผลิตเป็นกาวต่อไป ต่อมาได้มีการศึกษาการสกัดโปรตีนจากเศษหนังแบบ 2 ขั้นตอน (two step process) โดยใช้เอนไซม์ Alkalase ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 70-72 องศาเซลเซียสโดยการไฮโดรไลซ์ในสารละลายของเกลือ MgO พบว่า ไฮโดรไลเซตโปรตีนที่ได้จากการย่อยเศษหนังด้วยเอนไซม์ เมื่อใช้ MgO 6% มีปริมาณโครเมียมอยู่ 5 ppm และเมื่อใช้ MgO 3% ร่วมกับ NaOH หรือ KOH 2% จะมีโครเมียมอยู่ 14 และ 10 ppm ตามลำดับ และการใช้ MgO เพียงอย่างเดียว ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ MgO ร่วมกับ Na_2CO_3 หรือ K_2CO_3 (Taylor และคณะ , 1994)

นอกจากนี้ในทำฟาร์มปศุสัตว์ได้มีการศึกษาถึงการสกัดโปรตีนจากของเสีย โดยใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้คือ เขา และ กีบ ของวัว และ ควาย จะต้องทำให้มีขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 250 ไมโครเมตร สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเอนไซม์ทางการค้า ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* ในการย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์จะใช้เวลา 30-60 นาที pH เท่ากับ 8.3 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบกับเอนไซม์เป็น 1:0.05 และความเข้มข้นของ วัตถุดิบเท่ากับ 62.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งอัตราส่วนนี้จะลดลงเป็น 1:0.023 และ 61.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพิ่มรอบในการทำปฏิกิริยาในการทดลองให้มากกว่าหนึ่งรอบในการทำปฏิกิริยา (K. Kida, S. Morimura, J. Noda และคณะ , 1995)

P.G.Dalev และ L.S. Simeonova (1992) ได้ทำการศึกษาถึงการใช้อินไซม์ Alkaline proteinase จาก *B. subtilis* ในการย่อยเศษหนังชั้นล่างที่ได้จากการผ่าแยกชั้นก่อนการฟอกหนัง (lower splitting) ผลที่ได้แบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ไขมัน, คอลลาเจนไฮโดรไลเซต (collagen hydrolysate) และ โปรตีนคอนเซนเตรท (protein concentrate) โดยในส่วนของคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (collagen hydrolysate) นั้นเมื่อนำมาย่อยให้มีโมเลกุลเล็กลงจะได้เจลาติน (gelatin) และเมื่อนำมาผ่านการทำบริสุทธิ์จะทำให้ได้เจลาตินที่สามารถใช้ในการบริโภคได้ สำหรับในอุตสาหกรรม ภาพถ่ายได้มีการศึกษาถึงการผลิตเจลาตินเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เช่นเดียวกัน (Rainville และคณะ , 2000) จากการศึกษาพบว่า ประมาณ 0-25% ของเจลาตินที่สกัดได้ ประกอบด้วยเจลาตินที่มีน้ำหนัก โมเลกุลสูง (> 250,000) ประมาณ 0-20% ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเบต้า (150,000-250,000) และ ประมาณ 15-55% ประกอบด้วยส่วนที่เป็นแอลฟา (50,000-150,000) โดยเจลาตินที่ได้จะมีความ แข็งแรงของเจล (Gel strength) 150-350 g Bloom และมีค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร น้อยกว่า 0.069 เมื่อใช้อินไซม์โปรตีเอสที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10 ppb ของของเหลวผสมทั้งหมด แล้วทำ การกวนที่เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมเจลาตินที่ได้จะมีความหนืดน้อยกว่า 9 cps. (ที่ความเข้มข้น ของเจล 6.16 % อุณหภูมิ 104 องศาฟาเรนไฮต์) และเมื่อนำสารละลายเจลาตินที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ได้เจลาตินที่มีคุณภาพดีขึ้นด้วย

ต่อมาได้มีการศึกษาถึงการสกัดและกระบวนการทำแห้งของเจลาติน (Bajza Zeljko และ Vrcek Valerije , 2001) โดยใช้อินไซม์ alkaline protease ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในการสกัด โปรตีนออกจากเศษหนังที่ยังไม่ได้ผ่านการฟอก พบว่าการใช้อินไซม์ alkaline protease ที่ความ เข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 12000 units/g ของหนัง ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที สามารถให้ปริมาณโปรตีนออกมามากที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของเอนไซม์อื่นๆ ที่อุณหภูมิ และเวลาเดียวกัน โดยดูได้จากปริมาณของ dry substrate ที่เหลืออยู่มีปริมาณน้อยที่สุดและปริมาณ กรดอะมิโนที่มีอยู่ในสารละลายเจลาตินเมื่อใช้เวลาในการย่อยเศษหนังที่เหลืออยู่มากที่สุด และใน การทำแห้งของสารละลายเจลาตินโดยใช้ Dispersion drying system และ Rollers drying system จากการถ่ายภาพ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลที่ได้พบว่าการทำแห้งโดยใช้ Dispersion

drying system จะให้ขนาดของผงเจละดินที่เล็กมาก ก่อนข้างกลม และมีขนาดสม่ำเสมอ ส่วนการทำแห้งโดยใช้ Rollers drying system จะทำให้ได้เจละดินแห้งที่มีลักษณะเป็นแผ่นบาง

หลังจากนั้นได้มีการพัฒนากระบวนการสำหรับการสกัด โปรตีนและผลิตคอลลาเจนจากเศษหนังและกระดูก (S. Morimura, H. Nagata, Y. Uemura และคณะ , 2002) โดยใช้เอนไซม์ในการย่อยน้ำมัน และ สารประกอบอนินทรีย์จะถูกกำจัดออกไปก่อนในขั้นตอนของการ pretreatment และโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกสกัดออกมาภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (pH 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากหนังหมูจะมีขนาดใหญ่กว่า 100 กิโลดัลตัน และมีสมบัติในการเก็บรักษาน้ำไว้ในโมเลกุลได้ดีจึงเป็นประโยชน์ในการช่วยซ่อมแซมผิวหนังที่มีร่องรอยเหี่ยวย่น นอกจากนี้ยังไม่มีปัญหาเรื่องกลิ่นมารบกวนซึ่งได้ผ่านการทดสอบและยอมรับแล้วว่าสามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้ สำหรับกระดูกปลาและหนังหมูที่ผ่านการ pretreatment แล้วจะถูกนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า พบว่าส่วนที่ได้จากการย่อยนี้มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ($IPOX_{50}$, 0.18 และ 0.45 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร) และ ช่วยลดแรงดันเลือดได้ (IC_{50} , 0.16 และ 0.41 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังสามารถนำไปเป็นส่วนประกอบหรือเติมในอาหารได้อีกด้วย

2.3 สมมติฐาน

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสกัด และทำบริสุทธิ์ของเจละดินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่โดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส พร้อมทั้งศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติของเจละดินที่ได้กับสภาวะที่ใช้ในการทดลอง เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ ซึ่งในอุตสาหกรรมแต่ละประเภทยังมีความต้องการเจละดินที่มีสมบัติที่แตกต่างกัน ซึ่งสมบัติที่สำคัญของเจละดินที่ใช้ในการแบ่งประเภทของเจละดินนั้นได้แก่ ค่าความแข็งแรงของเจล และความหนืด สมบัติที่สำคัญของเจละดินเหล่านี้จะแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการสกัด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะได้ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติที่สำคัญของเจละดินกับสภาวะที่ใช้ในการสกัด โดยในขั้นตอนการสกัดเจละดิน จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อสมบัติของเจละดินที่ได้ด้วย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ เวลา อัตราเร็วในการกวน และ pH ที่ใช้ในการสกัด ต่อจากนั้นจะทำการแปรรูปสารละลายเจละดินที่ได้ให้อยู่ในรูปเจลาตินผง ส่วนในการทำบริสุทธิ์ของเจละดินจะเลือกใช้เจลฟิลเตชันโครมาโตกราฟี ซึ่งเป็นการแยกสาร โดยอาศัยขนาดของโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก โดยสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะหลุดออกมาก่อนสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แล้วทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์พร้อมทั้งหาน้ำหนักโมเลกุลของเจละดิน โดยใช้ Native-PAGE และ SDS-PAGE พร้อมทั้งหาปริมาณโปรตีนของเจละดิน และตรวจสอบสมบัติต่าง ๆ เพื่อแยก

ระดับของเจละติน ได้แก่ ความแข็งแรงของเจล, ความหนืด, การละลาย, pH, pI, คี, สารหนู, ทองแดง, สังกะสี, ตะกั่ว, โลหะหนัก, ซัลเฟอร์ไดออกไซด์, ความชื้น, เถ้า, ไขมัน, จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจละตินผงที่ได้จากการทดลอง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 เครื่องเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมความเย็น (Refrigerated Centrifuge)

รุ่น KB-20000T บริษัท Kubota, Japan

3.1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Recording spectrophotometer)

รุ่น UV-160 บริษัท Shimadzu, Japan

3.1.3 แหล่งจ่ายไฟฟ้า (Power Supply)

รุ่น Model 1000/500 บริษัท Bio-RAD สามารถปรับกระแสไฟฟ้าตามความต้องการได้

3.1.4 เครื่องปั่นกวน

ประกอบด้วยมอเตอร์ และใบกวนที่สามารถปรับความเร็วรอบ และความสูงของใบพัดตามต้องการได้ แกนใบกวนทำจากสแตนเลส

3.1.5 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบเตาอบ (Vacuum Drying Oven)

รุ่น DP 41 บริษัท Yamato Hitec, Japan สามารถปรับอุณหภูมิของเตาอบตามความต้องการได้

3.1.6 เตาอบ

รุ่น ConTherm Digital series Five บริษัท Jackson Electrical สามารถปรับระดับความร้อนตามต้องการได้

3.1.7 เตาเผา

รุ่น Carbolite CW F1200 บริษัท สามารถปรับระดับความร้อนตามต้องการได้

3.1.8 เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture analyser)

รุ่น TA-XT 2I ใช้หัววัด stable micro systems P/0.5HS บริษัท Stable micro systems

3.1.9 เครื่องวัดความหนืด (Brookfield analyser)

รุ่น Model DV-III ใช้หัววัด UL-Adapter บริษัท Brookfield engineering Labs. INC. สามารถควบคุมอุณหภูมิขณะทำการทดลองได้ และปรับความเร็วรอบพร้อมทั้งเวลาที่ใช้ในการทดลองได้

3.1.10 เครื่องวัดสี

รุ่น CR-300 บริษัท Minolta

3.1.11 มาตรฐานวัดความเป็น กรด - ด่าง (pH meter)

รุ่น F-13 บริษัท Horiba

3.1.12 ชุดอุปกรณ์สำหรับหาค่า pI

รุ่น Model 111 MINI IEF CELL บริษัท BIO-RAD

3.1.13 ชุดอุปกรณ์สำหรับหาน้ำหนักโมเลกุล

รุ่น Model No. Mini Trans-Blot Cell บริษัท BIO-RAD

3.1.14 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน/Desket

รุ่น NA 2000 N-Protein ยี่ห้อ FISONS Instruments

3.2 ตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงวัตถุดิบ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบ/สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	คุณสมบัติ	หน้าที่	ที่มา
1. เศษหนังเป็ยกชั้นในที่ยังไม่ผ่านการฟอก	บดละเอียด	เป็นวัตถุดิบหลักในงานวิจัย	บริษัท Wold Pet International
2. แอลคาไลน์โปรทีเอส มีชื่อทางการค้าว่า Savinase 12T	เม็ดเล็ก สีขาว	ย่อยโปรตีน	บริษัท Novo Nodisk
3. กรดกลูตาเมิลอะซิติก	สารละลายใส	ล้างสีข้อมโปรตีน	บริษัท BHD Chemical
4. กลีเซอรอล	สารหนืด ใส	เตรียม sample buffer	บริษัท Sigma-Aldrich
5. ไกลซีน	ผงสีขาว	เตรียม electrophoresis buffer	บริษัท Sigma-Aldrich
6. โคแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250	ผงสีน้ำเงิน	สีข้อมโปรตีน	บริษัท Sigma-Aldrich
7. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	ผงสีขาว	ใช้ทำให้ประจุของโปรตีนเป็นลบ	บริษัท BHD Chemical
8. โบรโมฟินอลบลู	ผงสีน้ำเงิน	เตรียม sample buffer	บริษัท Sigma-Aldrich
9. เมทิลรีนบิสอะคริละไมด์	ผงสีขาว	เตรียมโพลีอะคริละไมด์	บริษัท Sigma-Aldrich
10. อะคริละไมด์	เกร็ดขาว	เตรียมโพลีอะคริละไมด์	บริษัท Sigma-Aldrich
11. เอทิลแอลกอฮอล์, เมทิลแอลกอฮอล์	ความเข้มข้น 95%	ตัวทำละลาย	บริษัท Merck

ตารางที่ 3.1 แสดงวัตถุดิบ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

วัตถุดิบ/สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	คุณสมบัติ	หน้าที่	ที่มา
12. Ammonium persulfate	ความเข้มข้น 10%	ทำให้เกิดร่างแหของโพลีอะครีลาไมด์	บริษัท Sigma-Aldrich
13. Ampholyte	pH 3.5-10.0	เตรียม IEF	บริษัท Fluka
14. Bovine Serum Albumin	เกร็ดสีขาว	โปรตีนมาตรฐาน	บริษัท Fluka
15. di-Sodium hydrogen phosphate	ผงสีขาว	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck
16. Folin-Ciocalteu's phenol reagent	สารละลายสีเหลืองใส	หาปริมาณโปรตีน	บริษัท Merck
17. β -Mercaptoethanol	สารละลายใส	เตรียม SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich
18. Potassium dihydrogen phosphate	ผงสีขาว	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck
19. Sephadex G-100	ผงสีขาว	แยกโปรตีน	บริษัท Pharmacia
20. Stand gelatin high purity	เม็ดสีเหลืองอ่อน	เจลดินมาตรฐานในการทดลอง	บริษัท BIO BASIC INC.
21. Standard marker High Molecular Weigh	ผงสีขาว	โปรตีนมาตรฐาน	บริษัท Pharmacia
22. Standard marker Low Molecular Weigh	ผงสีขาว	โปรตีนมาตรฐาน	บริษัท Amersham
23. TEMED	สารละลาย	เร่งปฏิกิริยา Polymerization	บริษัท Sigma-Aldrich
24. Trichloroacetic acid	เกร็ดขาวใส	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	บริษัท Merck
25. Tris-HCl	ผงสีขาว	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck

3.3 การดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการสกัดและทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์จากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอก โดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรทีเอส โดยในส่วนของ การสกัดเอนไซม์ ทำการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ในการสกัดครั้งนี้ ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลา อุณหภูมิ และ pH ทำการวิเคราะห์หา น้ำหนักแห้ง ปริมาณโปรตีน ค่าความแข็งแรงของเจล ความหนืด การละลาย pH pI สี สารหนู ตะกั่ว โลหะหนัก และ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ความชื้น ปริมาณเถ้า ไขมัน การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด วิเคราะห์กรดอะมิโนในเอนไซม์ที่สกัดได้ แล้วนำผลที่ได้มาทำการประมวลผล เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ใช้ในการสกัดและสมบัติของเอนไซม์ที่สำคัญ โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ และในส่วนของ การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ ศึกษาถึงน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ได้ว่ามีความสัมพันธ์กับสมบัติของเอนไซม์ที่ได้หรือไม่ แล้วทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.4 ขั้นตอนการวิจัย

3.4.1 วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Savinase 12T โดยวิธี Azo-casein hydrolysis (อภิรดี, 2546 และ Regina Komsa-Penkova et al, 1996)

นำสารละลาย 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของ azo-casein ใส่ในหลอดทดลอง เติมบัฟเฟอร์ 0.9 มิลลิลิตร และ supernatant 0.1 มิลลิลิตร บ่มกับอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ นาน 20 นาที เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที หยุดปฏิกิริยา โดยเติม 10% Trichloroacetic acid (TCA) ที่เย็นจัด (4°C) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร (วิธีเตรียมสารและสูตรการคำนวณแสดงดังภาคผนวก ข)

หมายเหตุ : Blank : 1 ml azo-casein
1 ml buffer
2 ml 10% TCA
Control เติม 2 ml ของ 10% TCA ลงไปก่อนบ่มที่อุณหภูมิ

3.4.2 วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของหนังเปือก

ซึ่งตัวอย่างแห้งเปียก 10 กรัม เติมน้ำประปาปริมาตร 4 เท่าของน้ำหนักแห้ง (หรือ 40 ml) เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า pH

3.4.3 หาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างแห้งเปียกเริ่มต้น โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน/Deskjet

ซึ่งตัวอย่างแห้งเปียกประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่งในถ้วยสำหรับเผา นำตัวอย่างใส่ในช่องรับตัวอย่าง รอจนตัวอย่างเกิดการเผาไหม้ นำโครมาโตแกรมของผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนโดยใช้แฟกเตอร์ 6.25 ในการคำนวณ (โครมาโตแกรมของการทดลองแสดงในตารางที่ ๓.5 ภาคผนวก ๓)

3.4.4 ทำการทดลองสกัดเจลาตินจากหนังเปียกที่ยังไม่ผ่านการฟอก

3.4.4.1 ทำการทดลองสกัดเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์

ซึ่งตัวอย่างแห้ง 500 กรัม นำมาปั่นล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เเทน้ำล้างทิ้ง เติมน้ำ 0.1 M Phosphate buffer pH 8.00 ปริมาตร 4 เท่าของน้ำหนักแห้ง หรือเท่ากับปริมาตร 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำเอนไซม์ Savinase 12 T ที่ความเข้มข้น 200 U/mg, 1,000 U/mg, 3,000 U/mg, 5,000 U/mg, 7,500 U/mg, 10,000 U/mg และ ไม่เติมน้ำเอนไซม์(no enzyme) เพื่อใช้เป็นชุดทดลองควบคุมในการทดลอง ทำการสกัดเจลาตินที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 20 นาที ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2

3.4.4.2 ทำการทดลองสกัดเจลาตินด้วยเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ pH อุณหภูมิ และ เวลาในการสกัด

ซึ่งตัวอย่างแห้ง 500 กรัม นำมาปั่นล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เเทน้ำล้างทิ้ง เติมน้ำ 0.1 M Phosphate buffer pH 8.00, 9.50, 11.00 ปริมาตร 4 เท่าของน้ำหนักแห้ง หรือเท่ากับปริมาตร 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำเอนไซม์ Savinase 12 T ที่ความเข้มข้น 200, 5,000 และ 10,000 U/mg ทำการสกัดเจลาตินที่ อุณหภูมิ 40, 50, 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 20 นาที ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ

75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2

3.4.5 หาน้ำหนักแห้งของเจลาติน

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้มาอบแห้งโดยใช้ ตู้อบสูญญากาศ (Vacuum drying oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งของเจลาตินที่ได้

3.4.6 หาปริมาณโปรตีนของตัวอย่างหลังการอบแห้ง

3.4.6.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's (Komsa-Penkova et al,1996)

ปีเปตสารละลายตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับ Copper Solution 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที รอจนเย็นที่อุณหภูมิห้องจากนั้นเติมสารละลาย Folin-ciocalteu (Folin-ciocalteu : H₂O, 1:15) 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รอจนเย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 650 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 20, 40, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัม ต่อ 0.2 มิลลิลิตร (กราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก)

3.4.7 ตรวจสอบสมบัติทางเคมีและกายภาพของเจลาติน

3.4.7.1 วัดค่าความแข็งแรงของเจล หรือ Gel strength (ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC 1995 - 38.1.04)

เตรียมสารละลายเจลาติน 6.66% แล้วนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชม. นำไปวัดค่า Gel strength โดยเครื่อง Texture analyser หัววัด Stable Micro Systems P/0.5 HS (ปลายหัววัดมีลักษณะโค้งกึ่งวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 มิลลิเมตร) โดยกดผิวหน้าของเจลาตินให้ลึกลงไป 4 มิลลิเมตร มีหน่วยเป็น g Bloom

3.4.7.2 วัดค่าความหนืด (ดัดแปลงจาก Gudmundsson and Hafsteinsson, 1997)

เตรียมสารละลายเจลาติน 6.66 % แล้วทำการวัดความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด BROOKFIELD รุ่น Model DV-III ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที มีหน่วยเป็น cp

3.4.7.3 การละลาย (ดัดแปลงจาก มอก. 799-2531 ข้อ 4.3)

ทดสอบการละลายของเจลาตินโดยใช้ น้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส และตัวทำละลาย ได้แก่ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และ 95 % เอทานอล

3.4.7.4 pH (Choi S.S. and Regenstein J.M., 2000)

วัดโดยใช้ pH meter โดยใช้สารละลายเจลาตินความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนัก

3.4.7.5 สี

วัดโดยใช้ Spectrocolorimeter (Minolta Chroma Meter) รุ่น CR-300 เลือกใช้ระบบวัดสีแบบ L a b โดยมีเจลาตินที่มีความบริสุทธิ์เป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า ΔE เพื่อดูแนวโน้มของสีของเจลาตินที่ได้จากการสกัด (อรัญ หาญสืบสาย, 2547 และ Jamilah B. and Harvinder K.G., 2002)

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

3.4.7.6 สารหนู ตะกั่ว โลหะหนัก และ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์

ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี ICP atomic emission spectrometry มีหน่วยเป็น ppm โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.7.7 ปริมาณความชื้น

ตามวิธีวิเคราะห์ของ A.O.A.C. 1980 - 14.004 ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก

3.4.7.8 ปริมาณเถ้า

ตามวิธีวิเคราะห์ของ A.O.A.C. 1980 - 14.006 ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก

3.4.7.9 ไขมัน (%Fat)

ตามวิธีวิเคราะห์ของ A.O.A.C. 1980 - 7.056 ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก

3.4.7.10 Microbiology test ทำการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ก. วิธีเตรียมสารละลาย (บุญรัตน์ และ นงนุช , 2533)

ซึ่งตัวอย่างเจละดินผงมา 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจะ ได้ความเข้มข้น 1 ต่อ 10 แล้วทำให้เจือจางต่อไปจนกว่าจะอ่านจำนวนจุลินทรีย์ได้ 30 ถึง 300 โคโลนี

ข. วิธีเตรียมเพลตเคานต์อะการ์ (plate count agar) ดัดแปลงจากวิธีของ มอก. 335 เล่ม 1-2523 (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก)

3.4.8 วิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) เพื่อหาความมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละปัจจัย และระหว่างปัจจัยของสภาวะ (ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0-10,000 U/mg, อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส, เวลา 20-180 นาที และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8-11) ที่ใช้ในการสกัดกับคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของเจละดิน (ค่าความแข็งแรงของเจลและความหนืด) โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะที่ใช้สกัดกับสมบัติที่สำคัญของเจละดินที่ได้ เพื่อทำนายค่าความแข็งแรงของเจลและความหนืดที่ได้จากการทดลองสกัดที่สภาวะต่าง ๆ โดยใช้ Multiple Regression

3.4.9 การทำบริสุทธิ์ของเจละดิน โดยใช้ เจลฟิลเตรชัน ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100

นำเจละดินผงที่ได้จากการทำแห้ง ที่ทำการสกัดที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg แต่ pH ต่างกัน ได้แก่ pH 8.0, 9.5, 11.0 และ ที่ pH 9.5 แต่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ (control) มาละลายด้วย 0.1 M phosphate buffer ที่ pH 8.0, 9.5, 11.0 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 โดยใช้สารละลาย 0.1 M

phosphate buffer ที่ pH 8.0, 9.5, 11.0 เป็นสารละลายชะ (Eluent) เก็บตัวอย่างหลอดละ 2 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราการไหล 30 ml/hr นำแต่ละตัวอย่างแต่ละหลอด ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ทดสอบหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry แล้วนำสารละลายเจลดินที่ได้ไปทำการไดอะไลซ์ด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เปลี่ยนน้ำกลั่นทุก ๆ 4-6 ชั่วโมง)

3.4.10 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของเจลดิน โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอนดิเนเจอร์ และ แบบดีเนเจอร์

3.4.10.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานผสมกับสารละลาย sample buffer (การเตรียม sample buffer ดังในภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร นำไปทำการตรวจสอบโดยหยดลงในช่องเจล ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่อง

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight) ได้แก่ Thyroglobulin (M.W. 669,000), Ferritin (M.W. 440,000), Catalase (M.W. 232,000), Lactate dehydrogenase (M.W. 140,000) และ Albumin (M.W. 67,000) กลุ่มที่ 2 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight) ได้แก่ Phosphorylase b (M.W. 97,000), Albumin (M.W. 66,000), Ovabumin (M.W. 45,000), Carbonic anhydrase (M.W. 30,000), Trypsin inhibitor (M.W. 20,100) และ α - Lactalbumin (M.W. 14,000)

3.4.10.2 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ชนิดแผ่น

การเตรียมเจลใช้กระจก 2 แผ่นขนาด กว้าง 8 ยาว 10 เซนติเมตร และ กว้าง 7 ยาว 10 เซนติเมตร มีแผ่นพลาสติก (spacer) ขนาดกว้าง 0.9 ยาว 8.5 หนา 0.1 เซนติเมตร วางเป็นกรอบแม่พิมพ์ นำ separating gel (วิธีเตรียมดังภาคผนวก ข) ที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ เทลงในกระจกแม่พิมพ์อย่างช้า ๆ โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ให้เจลมีความสูง 5 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้จนแผ่นเจลแข็งตัว (ประมาณ 45-90 นาที) เทน้ำส่วนบนทิ้ง จากนั้นเททับด้วยสารละลาย stacking gel ที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 3 เปอร์เซ็นต์ (วิธีเตรียมดังภาคผนวก ข) ใส่แม่พิมพ์ลงในช่องเจล (comb) ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว (ประมาณ 30-60 นาที)

3.4.10.3 การย้อมสีโปรตีนในแผ่นโพลีอะคริลอะไมด์เจล

นำแผ่นเจลที่ผ่านขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส ไปย้อมสีของโปรตีนด้วย สารละลายโคแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250 (coomassie brilliant blue R 250 : วิธีเตรียมดัง ภาคผนวก ข) เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชะสีส่วนเกินออก โดยแช่ในสารละลายล้าง สีย้อมโปรตีน (destaining solution : วิธีเตรียมดังภาคผนวก ข) จนกระทั่งส่วนที่เป็นโปรตีนบนเจล ปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงินชัดเจน และนำแผ่นเจลมาทำแห้ง แล้วคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุล (แสดงดัง ภาคผนวก ง)

3.4.11. pI (Surachai, 2003)

วัดโดยใช้ ไอโซอิเล็กตริก โฟกัสซิง อิเล็กโตรโฟเรซิส (Isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis :IEF)

3.4.11.1 การเตรียมแผ่นรองรับเจล (Preparation of gel support film)

ทำความสะอาดแผ่นกระจกด้วยเอทานอลร้อยละ 70 จนสะอาด หยคน้ำลงบน แผ่นกระจกเล็กน้อย นำแผ่นพลาสติกรองเจลมาประกบติดกับแผ่นกระจกด้านที่มีน้ำโดยระวังอย่าให้ เกิดฟอง แล้วนำมาคว่ำลงบนถาดสำหรับเซทเจล โดยคว่ำด้านที่เป็นแผ่นพลาสติกลงด้านล่าง

3.4.11.2 การเตรียมโพลีอะคริลอะไมด์เจลสำหรับ IEF

เตรียมสารละลายโพลีอะคริลอะไมด์เจล สำหรับ IEF (วิธีเตรียมดูรายละเอียดใน ภาคผนวก ข) แล้วนำไปทำให้ปราศจากฟองอากาศเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารละลายโพลีอะคริลอะไมด์เจลมาเทลงในช่องว่างระหว่างแผ่นพลาสติกกับถาดรอง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งไว้เป็นเวลา 45-90 นาที จนเจลแข็งตัว แล้วจึงแกะแผ่นพลาสติกที่เจลเซทตัวแล้วออกจากถาด หางยด้านที่มีเจลขึ้น เตรียมหยดตัวอย่างต่อไป

3.4.11.3 การเตรียมตัวอย่าง และการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส

นำสารละลายตัวอย่างไปทำการเอาเกลือออกในน้ำกลั่น โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 2 วัน โดยใช้ถุงไดอะไลซิส นำตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมดังกล่าวมาหยดลงบนตรง

กลางของแผ่นเจลหุ้มละ 10 ไมโครลิตร รอยสารละลายตัวอย่างซึมเข้าเนื้อเจลจนหมดแล้วจึงนำมาให้กระแสไฟฟ้า โดยขั้นแรกให้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ขั้นที่สองให้กระแสไฟ 200 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ขั้นที่สามให้กระแสไฟ 400 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที นำแผ่นเจลที่ผ่านการให้กระแสไฟฟ้ามาข้อมใน Fixative reagent เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง แล้วนำไปข้อมสีของโปรตีนด้วยสารละลายโคแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250 (coomassie brilliant blue R 250 : วิธีเตรียมดังภาคผนวก ข) เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชะสีส่วนเกินออก โดยแช่ในสารละลายล้างสีข้อมโปรตีน (destaining solution : วิธีเตรียมดังภาคผนวก ข) จนกระทั่งส่วนที่เป็นโปรตีนบนเจลปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงินชัดเจน และนำแผ่นเจลมาทำแห้ง แล้วคำนวณหาค่า pI (แสดงดังภาคผนวก ง)

3.4.12 วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจละตินผง (Lui H.J. et. al., 1995)

3.4.12.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่าง 200 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองเดิม 6 N ของกรดไฮโดรคลอริก ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง ทำให้เย็น เติมสารมาตรฐาน (Internal standard) ลงไปแล้วเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน นำตัวอย่างที่กรองแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ AccQ • fluor derivatization buffer ปริมาตร 70 ไมโครลิตร แล้วเติม AccQ • fluor reagent ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงไป นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.4.12.2 การวิเคราะห์

HPLC System	:	WATERS Alliance 2695 with heater WATERS 2475 Multi Fluorescence Detector (EX:250, EM 395 nm)
Column	:	AccQ • Tag column (dimensions 3.9 x 150 mm particle size 4 µm) Control Temp. 37 ± 1 °C
Injection volume:		1 µl
Eluents	:	AccQ • Tag Eluent A Acetonitrile Deionized water

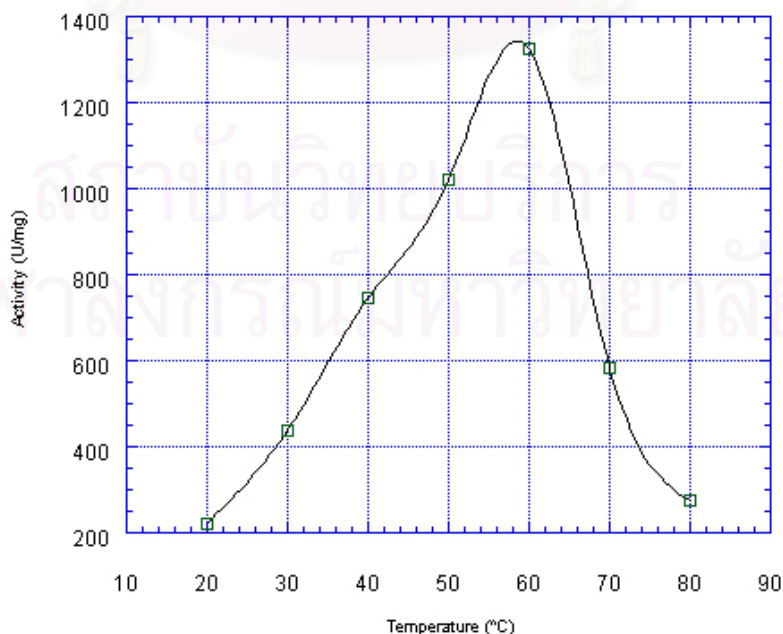
บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผล

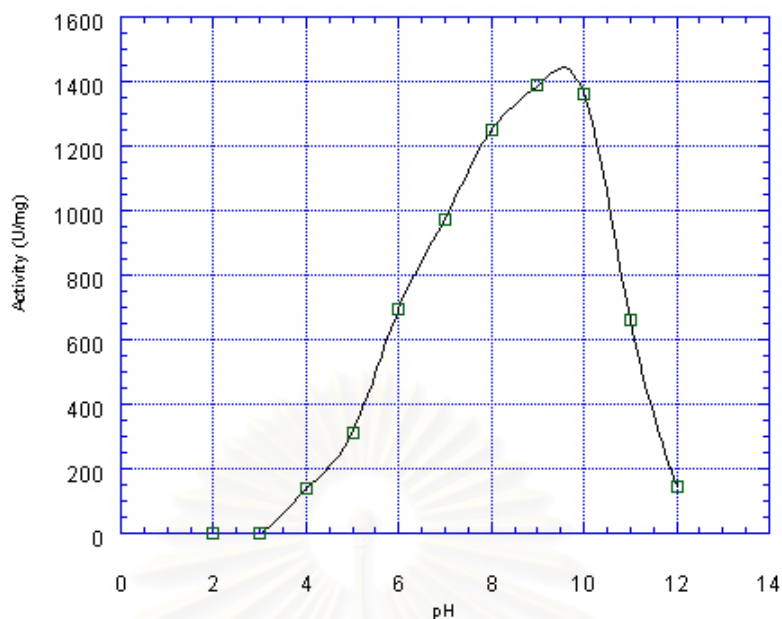
งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการสกัด และทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์จากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้แอลกอฮอล์โปรทีเอส ในส่วนของการสกัดเอนไซม์จะเริ่มทำการศึกษาจากการหาสมบัติเฉพาะตัวในการทำงานของเอนไซม์ พร้อมทั้งวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของตัวอย่างหนึ่ง แล้วจึงหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัด ต่อจากนั้นจะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดเอนไซม์ แล้วจึงนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทำแห้ง และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผงเอนไซม์ ส่วนการศึกษาการทำบริสุทธิ์ จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ได้ และศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดและสภาวะที่ใช้ในการสกัดโดยใช้โปรแกรม SPSS ต่อไป

4.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Savinase 12T โดยวิธี Azo-casein hydrolysis

จากการหาสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์ Savinase 12T นั้น สมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์ที่สนใจศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการทำงาน โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส และที่ pH 2-12 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 Optimum – Temperature ของเอนไซม์ Savinase 12 T ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.2 Optimum – pH ของเอนไซม์ Savinase 12 T ที่ pH 9

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 20-60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีความทำงานดีที่สุด มีแอกติวิตี (activity) เท่ากับ 1,325 U/mg แต่เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นมากกว่า 60 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนในรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดียิ่งขึ้นเมื่อค่าของ pH เพิ่มขึ้นในช่วง pH 4-10 โดยค่าของ pH ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีจะมีช่วงค่อนข้างกว้างคือ pH 8-10 ซึ่งค่าของ pH ที่เอนไซม์มีความทำงานสูงที่สุดคือ pH 9 มีแอกติวิตีเท่ากับ 1,387 U/mg และการทำงานของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อสภาวะที่ใช้ในการทำงานของเอนไซม์มีค่า pH มากกว่า 10.0

4.2 การศึกษาองค์ประกอบของตัวอย่างหนังเปือก

ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง และองค์ประกอบของตัวอย่างหนังเปือกที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง และองค์ประกอบของหน้งเปียก

องค์ประกอบของหน้ง	ค่าที่ได้ *
pH	11.81
โปรตีน	16.00 %
ไขมัน	1.31 %
ความชื้น	62.83 %
เถ้า	4.12 %

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

จากการทดลองศึกษาสมบัติเบื้องต้นของตัวอย่างหน้งเปียกที่ใช้ในการทดลอง พบว่าหน้งเปียกที่ยังไม่ผ่านการฟอกที่ได้มาจากโรงงานนั้น มีค่า pH ที่วัดได้จากสารละลายน้ำประปาที่ใช้ในการแช่หน้งเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ประมาณ 11.81 มีปริมาณโปรตีนในหน้งเปียกเท่ากับ 16.00 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไขมัน 1.31 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 62.83 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 4.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.3 ศึกษาการสกัดเจละตินจากหน้งเปียก

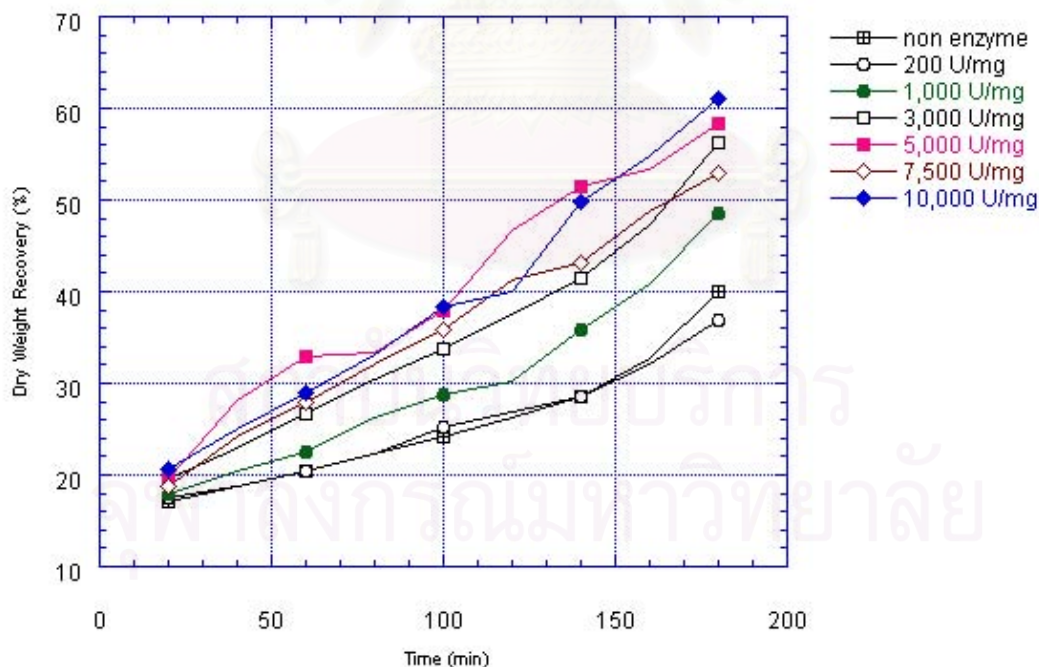
ในขั้นตอนของการสกัดเจละตินจะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกจะทำการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดเจละตินก่อน โดยแปรค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ 6 ค่า แล้วทำการทดลองที่อุณหภูมิ เวลา pH และ ความเร็วรอบในการกวนเดียวกัน ส่วนในขั้นตอนที่ 2 จะทำการเลือกค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนแรกมาเพียง 3 ค่า เพื่อทำการทดลองต่อ โดยในขั้นตอนที่ 2 นี้จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดเจละติน 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลา อุณหภูมิ และ pH โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล

4.3.1 ศึกษาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์สำหรับการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ในการสกัดเจละติน

ในการศึกษานี้เป็นการหาช่วงความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ โดยทำการสกัดเจละตินที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยเอนไซม์ที่ใช้จะมีความเข้มข้นในช่วง 200 - 10,000 U/mg เปรียบเทียบกับการไม่ใช้เอนไซม์ ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทุก 20 นาที เป็นเวลา 180 นาที นำตัวอย่างที่ได้มาทำให้แห้ง วัดหาปริมาณโปรตีน ค่าความแข็งแรงของเจล และความหนืด ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.3.1.1 ผลของน้ำหนักรงของเจลละตินหลังจากการทำแห้งโดยใช้ตู้อบสุญญากาศในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชม.

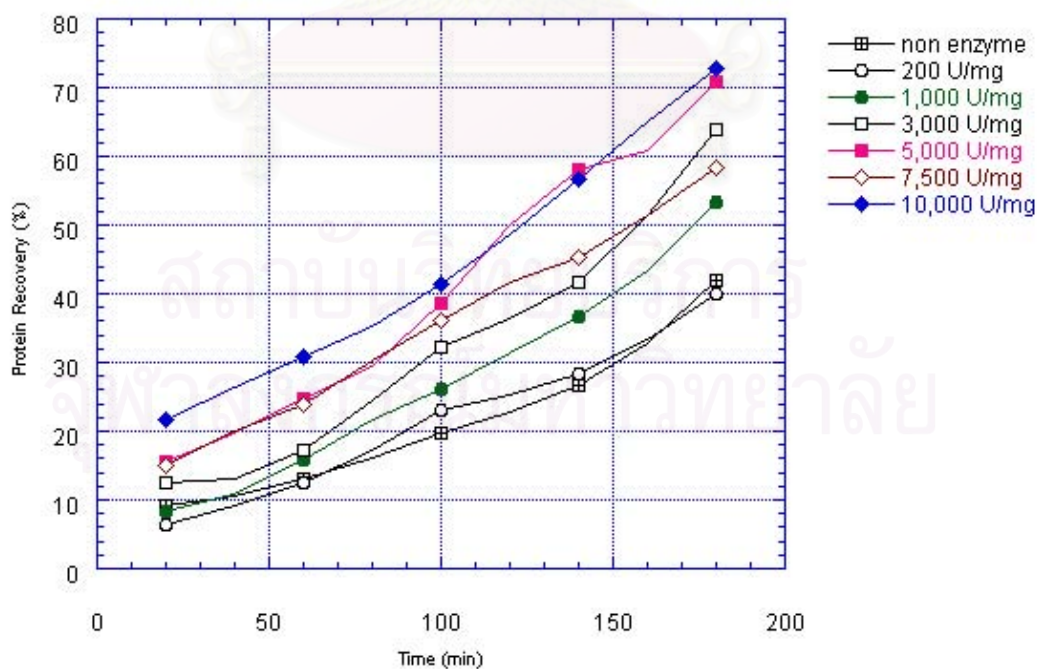
จากการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของตัวอย่างเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 0-10,000 U/mg ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 พบว่าน้ำหนักของตัวอย่างเจลละตินจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเพิ่มมากขึ้นและยังไม่มีแนวโน้มที่จะคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที (รูปที่ 4.3) เมื่อพิจารณาผลของปริมาณของเอนไซม์ต่อน้ำหนักของเจลละตินรวมทั้งหมด ที่เวลา 180 นาที พบว่าปริมาณของเจลละตินที่สกัดได้จะแปรผันตามความเข้มข้นของเอนไซม์ ในช่วง 0-5,000 U/mg แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มากขึ้นปริมาณเจลละตินรวมทั้งหมดที่ได้จะค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่ควรใช้ในการสกัดให้ได้ปริมาณเจลละตินสูงสุดจะมีค่าประมาณ 5,000 U/mg อย่างไรก็ตามในการสกัดเจลละตินเพื่อการใช้งานด้านต่างๆ นั้น จะต้องคำนึงถึงคุณสมบัติอื่นๆ ด้วยเช่น ความหนืด ความแข็งแรงของเจล ดังนั้นในการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้สูงกว่า 5,000 U/mg แม้จะไม่มี的增加ขึ้นของปริมาณเจลละตินที่สกัดได้ แต่อาจมีผลต่อคุณสมบัติของเจลละตินซึ่งจะได้ทำการศึกษาในขั้นต่อไป (ตัวอย่างการคำนวณน้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้กลับคืนมาเป็นเปอร์เซ็นต์แสดงในภาคผนวก ก)



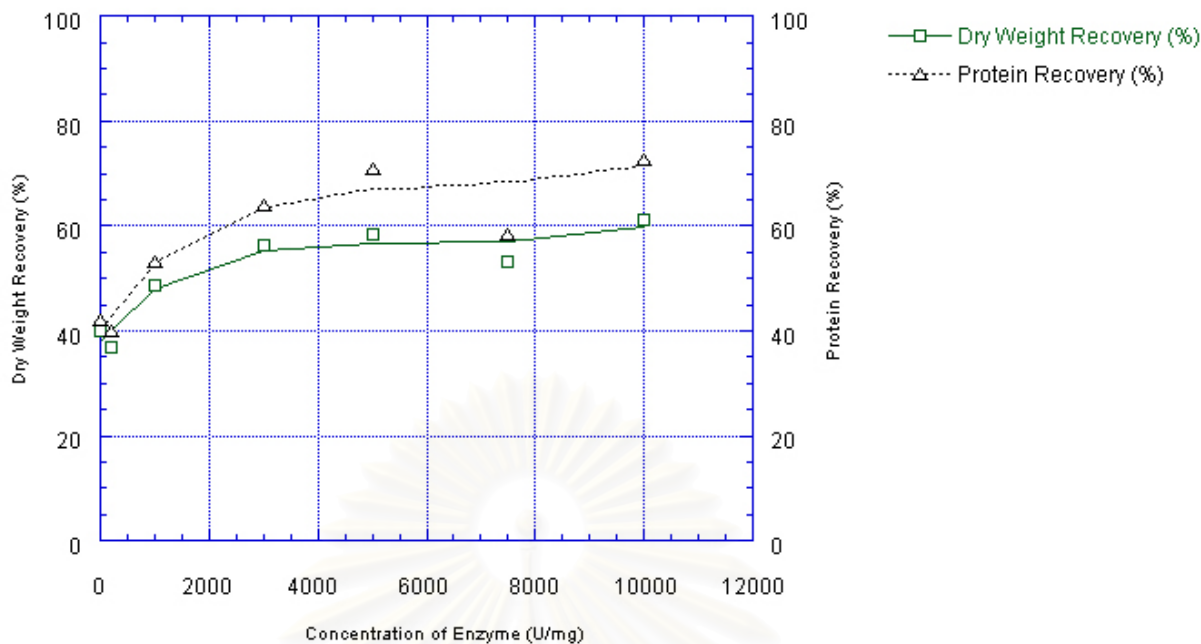
รูปที่ 4.3 น้ำหนักของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.1 ในภาคผนวก ก)

4.3.1.2 ผลของปริมาณโปรตีนของเจละตินหลังการทำแห้งโดยใช้ตู้อบสุญญากาศในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชม.

ในการหาปริมาณเจละตินที่ได้จากการสกัดในรูปของน้ำหนักแห้งโดยรวมอาจมีความคลาดเคลื่อน เนื่องจากสารสกัดที่ได้อาจมีสารอื่นเช่น ไขมัน หรือสารอื่นที่ปนเปื้อนมากับหนังเป็ยกปนอยู่ ดังนั้นจึงทำการหาปริมาณเจละตินในรูปของโปรตีนซึ่งจะเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณของเจละตินที่ได้ให้มีความถูกต้องมากขึ้น ซึ่งจากการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน (กราฟมาตรฐาน BSA ตาราง ง.1 ภาคผนวก ง) ของตัวอย่างเจละตินแห้ง พบว่าปริมาณโปรตีนของเจละตินจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการทดลองเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 4.4) และ ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นนี้มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกับน้ำหนักของเจละติน โปรตีนที่สูงที่สุดที่ได้กลับคืนมามีค่าเท่ากับ 72.74 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg เวลา 180 นาที และจากการเปรียบเทียบปริมาณเจละตินในรูปของน้ำหนักแห้งกับปริมาณโปรตีน พบว่าเส้นกราฟมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเหมือนกัน แต่ปริมาณโปรตีนที่ได้มีค่าสูงกว่าปริมาณน้ำหนักแห้งของเจละตินและมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดเจละตินที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำ ๆ มีสารอื่นปนออกมา และเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้น ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นมากกว่าการปนเปื้อน ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ได้กลับคืนมาเป็นเปอร์เซ็นต์มีค่าที่สูงเพิ่มขึ้น ในรูปที่ 4.5 (ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโปรตีนของเจละตินที่ได้กลับคืนมาเป็นเปอร์เซ็นต์แสดงในภาคผนวก ก)



รูปที่ 4.4 ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.2 ในภาคผนวก จ)

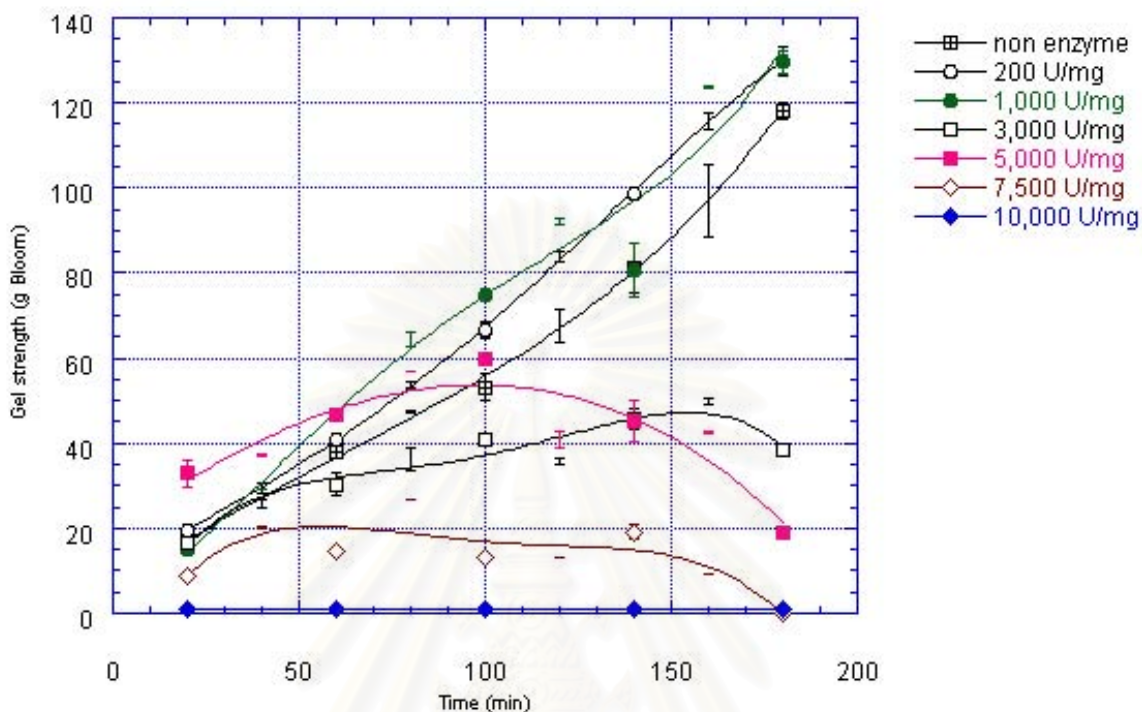


รูปที่ 4.5 นำหนักแห้งและปริมาณโปรตีนของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.21 ในภาคผนวก จ)

4.3.1.3 ผลของความแข็งแรงของเจล หรือ ค่า ความแข็งแรงของเจล

เมื่อนำเจละดินที่ได้จากการสกัดมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพที่สำคัญของเจละดิน ได้แก่ ความแข็งแรงของเจล และความหนืดเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในการทดลองขั้นต่อไป จากการวิเคราะห์พบว่าค่าความแข็งแรงของเจลที่ได้จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของเอนไซม์ (รูปที่ 4.8) คือ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นค่าความแข็งแรงของเจลจะมีค่าต่ำลงและเมื่อพิจารณาถึงผลของเวลาที่ใช้ในการย่อย พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำกว่า 1000 U/mg ความแข็งแรงของเจลจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 3000, 5000, 7500 และ 10,000 U/mg ความแข็งแรงของเจลจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการสกัดและจะลดลงเมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดนานขึ้น (รูปที่ 4.6) ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องมาจากที่ความเข้มข้นของเอนไซม์สูง ๆ เอนไซม์มีปริมาณมากพอที่ย่อยสายโพลีเพปไทด์ของเจละดินให้สั้นลงมาก แต่ยังสามารถเกิดเจลได้ ทำให้ค่าความแข็งแรงของเจลที่วัดได้มีค่าต่ำ และเมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้นสายของโพลีเพปไทด์ยังสั้นลงจนเป็นโปรตีนชิ้นเล็ก ๆ (fragments) ที่ไม่สามารถเกิดเจลได้ เนื่องจากพันธะเพปไทด์ของเจละดินถูกตัดหรือย่อยให้สั้นลงในกระบวนการสกัด (Linus G. Fonkwe, 1997) แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์น้อยกว่า 1,000 U/mg สายโพลีเพปไทด์จะถูกตัดให้สั้นลงแต่ยังมีความยาวพอที่จะเกิดเจลที่มีความแข็งแรงได้ ดังนั้นเจละดินที่ได้จึงยังคงมีค่าความแข็งแรงของเจลที่สูงอยู่ และเมื่อเวลา

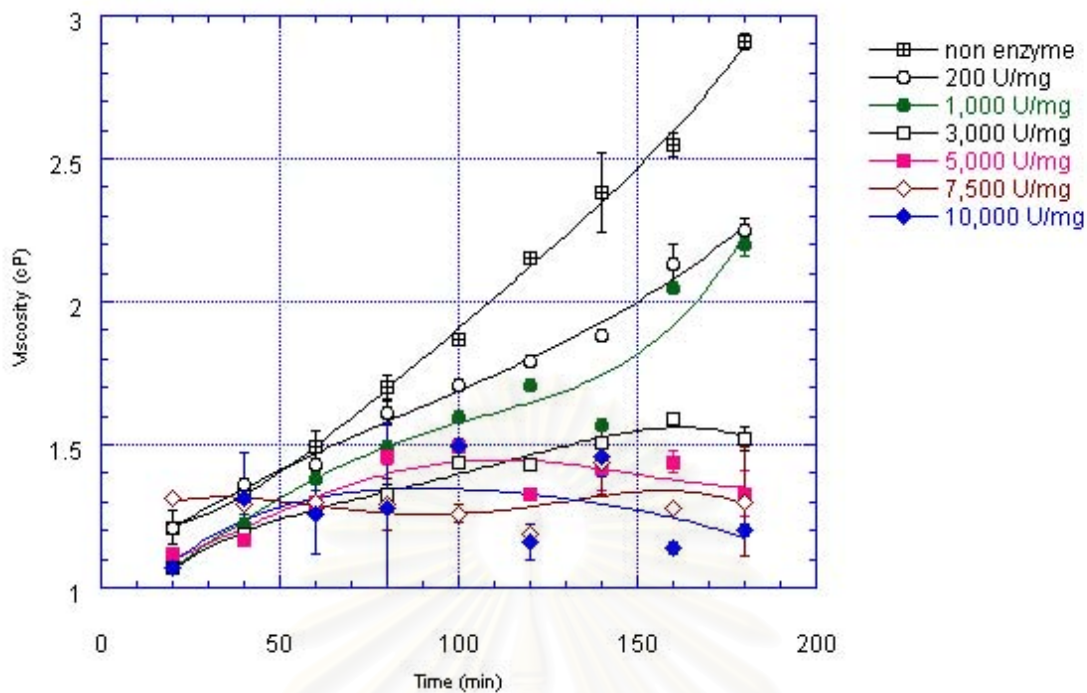
เพิ่มขึ้นปริมาณของคอลลาเจนที่ถูกย่อยเป็นเจลาตินก็มีเพิ่มขึ้นจึงทำให้ได้เจลาตินที่มีความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น



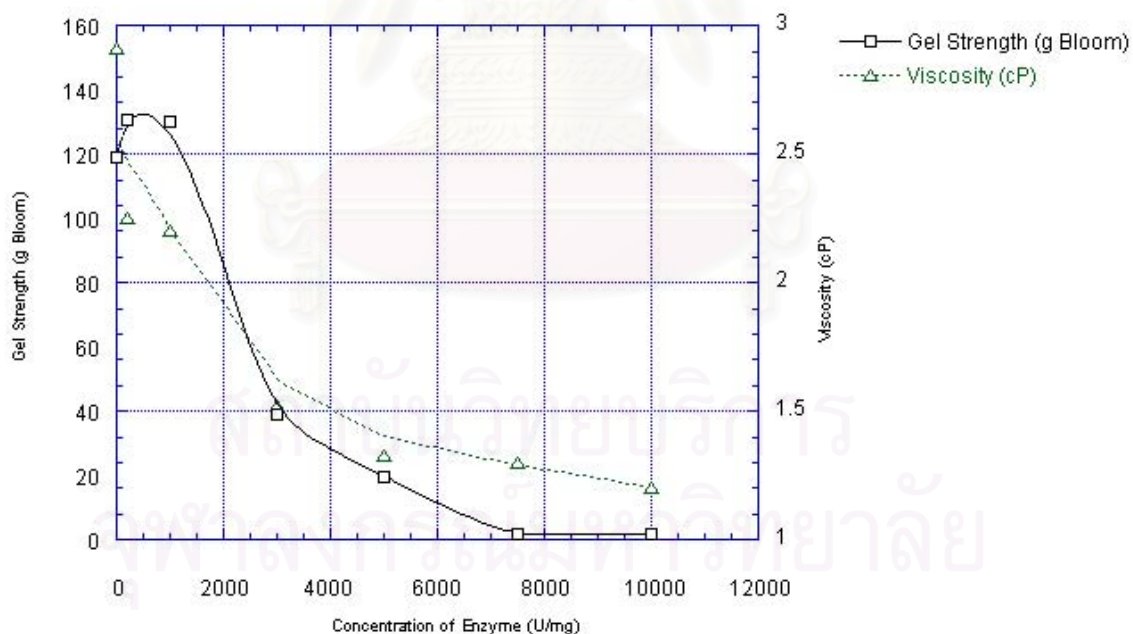
รูปที่ 4.6 ค่าความแข็งแรงของเจลของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 (ข้อมูลการทดลอง แสดงดังตารางที่ จ.3 ในภาคผนวก จ)

4.3.1.4 ผลของค่าความหนืด

จากการวิเคราะห์ค่าความหนืดของสารละลายเจลาตินที่ความเข้มข้น 6.67 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าความหนืดของเจลจะมีค่าแปรผกผันกับความเข้มข้นของเอนไซม์ คือ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเพิ่มมากขึ้นความหนืดของเจลจะลดต่ำลง (รูปที่ 4.7) และความหนืดของเจลจะมีค่าแปรผันตามกับค่าความแข็งแรงของเจล (รูปที่ 4.8) ส่วนผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดจะเหมือนกับค่าความแข็งแรงของเจล



รูปที่ 4.7 ความหนืดของเจลละตินที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 (ข้อมูล การทดลองแสดงดังตารางที่ จ.4 ในภาคผนวก จ)



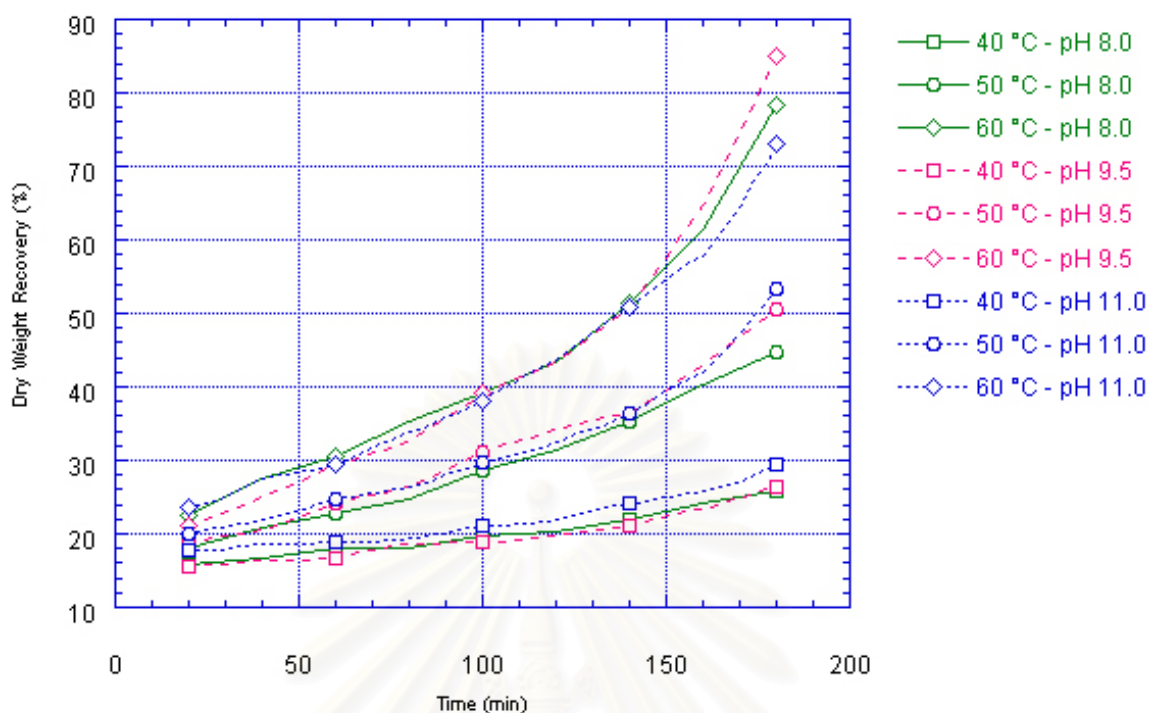
รูปที่ 4.8 ค่าความแข็งแรงของเจลกับความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตาราง ที่ จ.21 ในภาคผนวก จ)

จากผลการทดลองที่ได้ ได้ทำการเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ 3 ค่า คือ 200 U/mg เป็นตัวแทนของเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่ำ, 5000 U/mg เป็นตัวแทนของเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นปานกลาง และ 10,000 U/mg เป็นตัวแทนของเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อนำมาทำการสกัดเจลละตินที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้คือ 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 และ 180 นาที และที่ pH 8.00 pH 9.50 และ pH 11.00 ต่อไป โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลดิไซน์

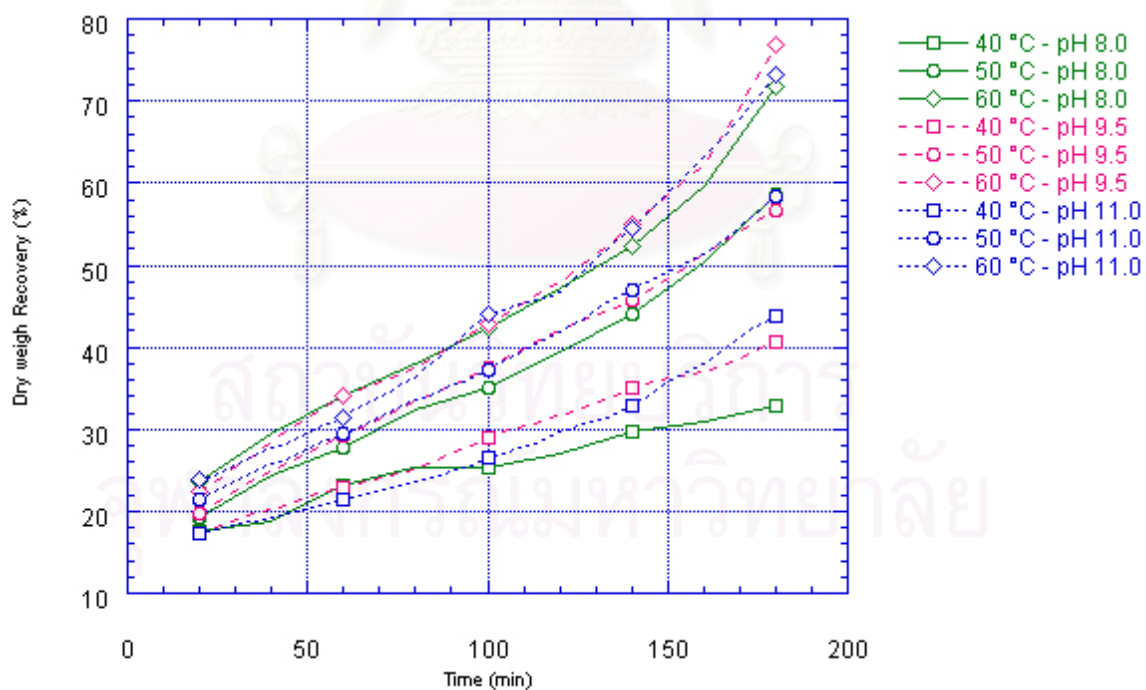
4.3.2 ศึกษาการสกัดเจลละตินด้วยเอนไซม์ Savinase 12T ที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลา อุณหภูมิ และ pH ในการสกัด

4.3.2.1 ผลของน้ำหนักรงของเจลละตินหลังจากการทำแห้งโดยใช้ตู้อบสุญญากาศในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชม.

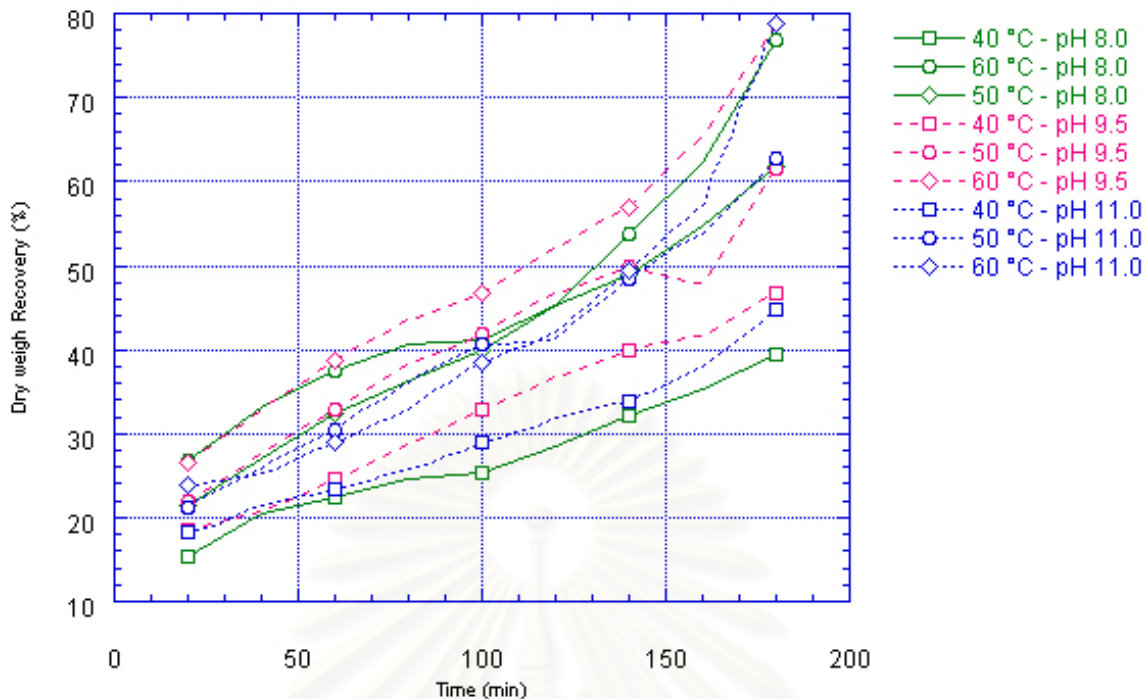
ผลของการเปรียบเทียบน้ำหนักรงของเจลละตินที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเจลละตินเท่ากับ 200 U/mg พบว่าน้ำหนักรงของตัวอย่างจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น และมีอุณหภูมิในการสกัดเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ส่วนค่าของ pH ที่เหมาะสมในการทดลองที่ทำให้น้ำหนักรงของตัวอย่างสูงที่สุด คือ pH 9.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และจากผลการทดลองทำให้สามารถแบ่งช่วงน้ำหนักรงของเจลละติน ได้เป็นสามช่วงตามอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองได้แก่ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.9) โดยสภาวะที่ทำให้ได้น้ำหนักรงของเจลละตินมากที่สุดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 9.5 เวลา 180 นาที ได้น้ำหนักรงของเจลละตินกลับคืนมาถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นภาวะที่กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงที่สุด (ตัวอย่างการคำนวณน้ำหนักรงของเจลละตินที่ได้กลับคืนมาเป็นเปอร์เซ็นต์แสดงในภาคผนวก ก) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเป็น 5,000 U/mg และ 10,000 U/mg พบว่าน้ำหนักรงของเจลละตินที่ได้กลับคืนมามีรูปแบบเหมือนกับที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg คือ สามารถแบ่งกลุ่มของน้ำหนักรงเจลละตินได้เป็น 3 กลุ่มตามอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด และจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.10 และ 4.11) ส่วนในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ในการสกัดนั้นผลที่ได้มีรูปแบบเหมือนกับการสกัดที่มีการใช้เอนไซม์ แต่น้ำหนักรงของเจลละตินที่ได้มีค่าน้อยกว่า (รูปที่ 4.12) ซึ่งเจลละตินผงที่ได้จากการสกัดนี้อาจมีสารอื่นปนอยู่ เช่น ไขมัน จึงได้ทำการทดลองหาปริมาณโปรตีนที่ได้ โดยวิธี Lowery's เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้อีกครั้ง



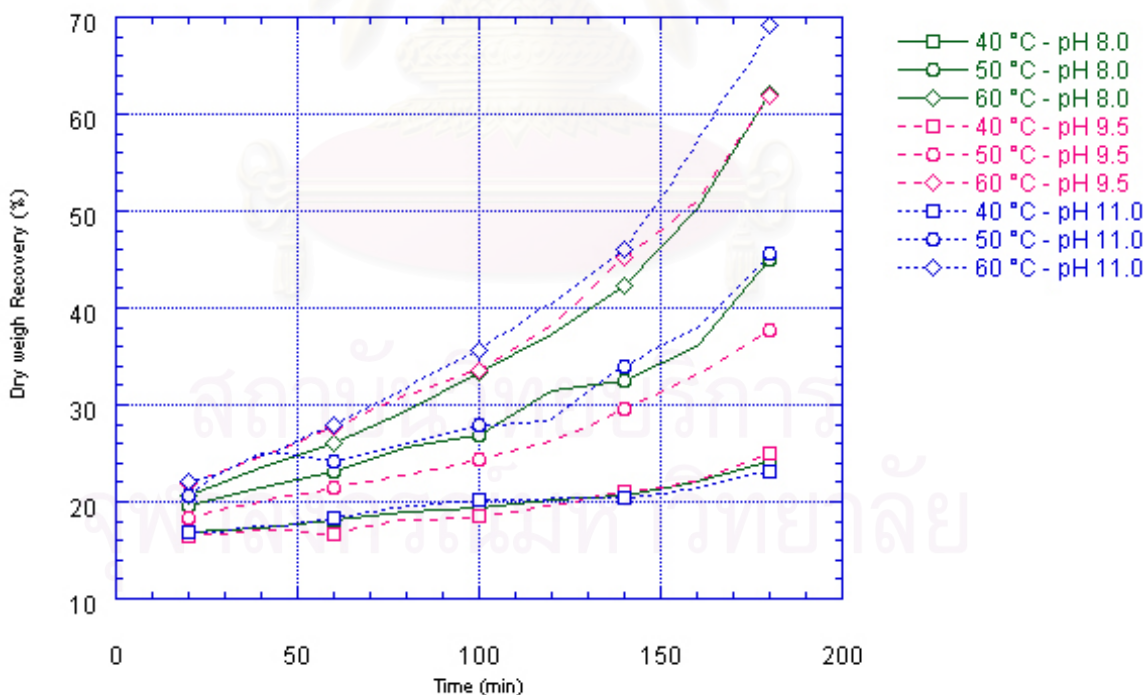
รูปที่ 4.9 น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.5 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.10 น้ำหนักแห้งของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.6 ในภาคผนวก จ)



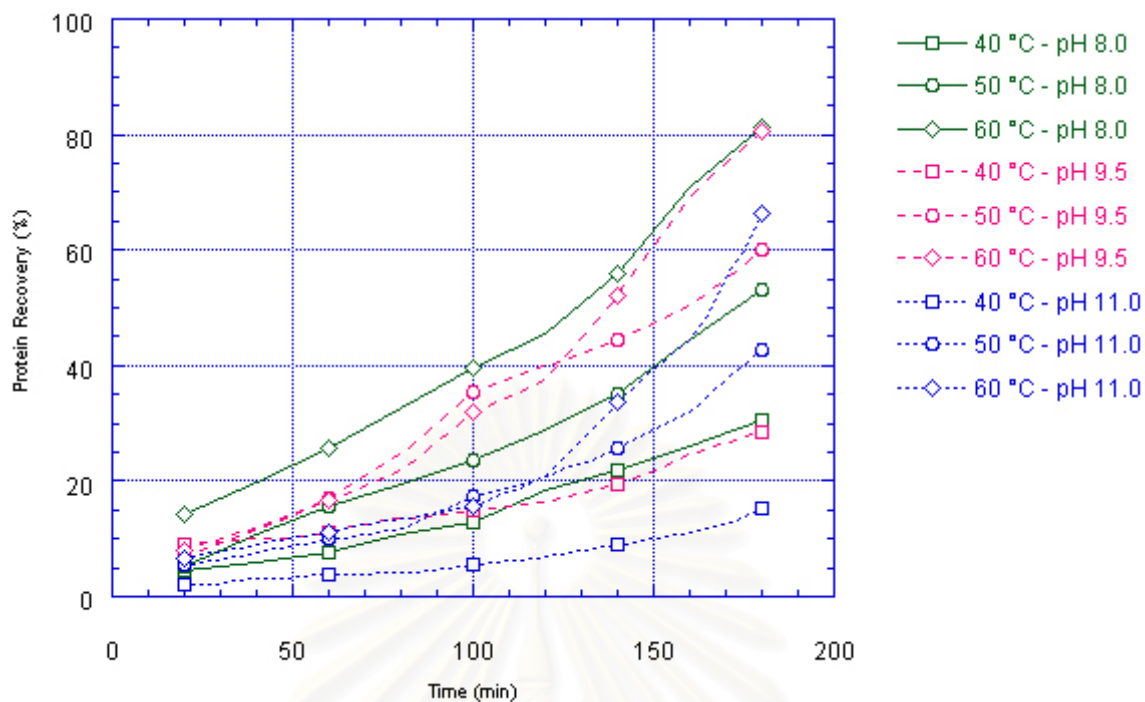
รูปที่ 4.11 น้ำหนักแห้งของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลาอุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.7 ในภาคผนวก จ)



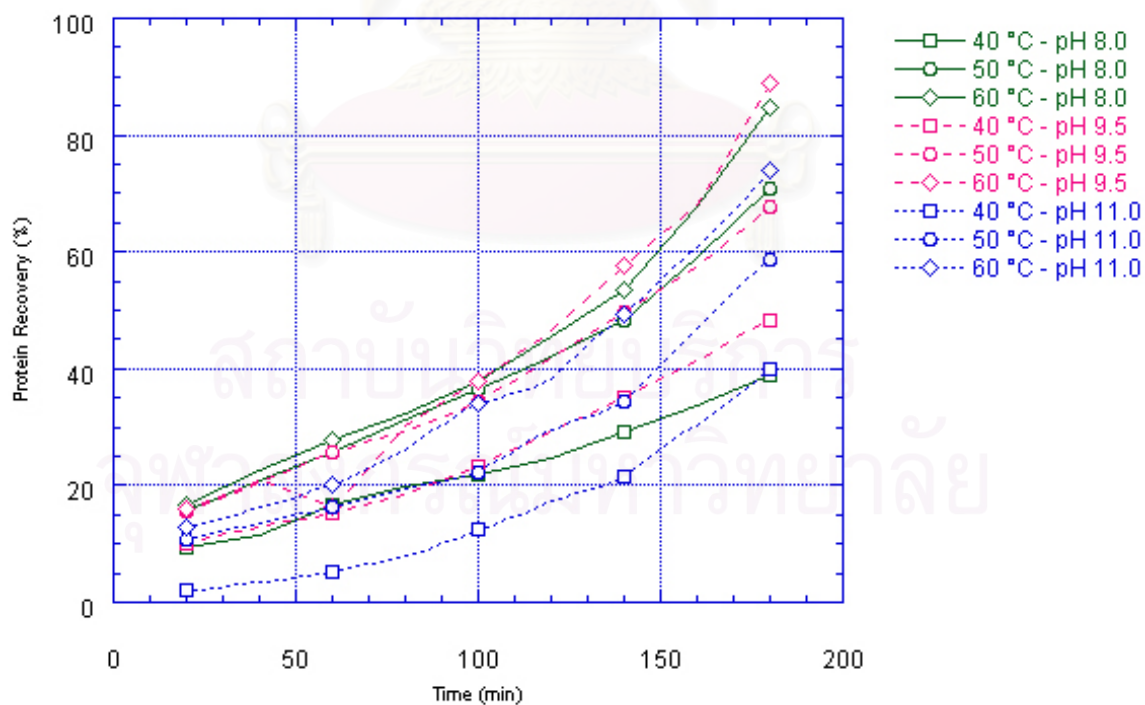
รูปที่ 4.12 น้ำหนักแห้งของเจละดินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.8 ในภาคผนวก จ)

4.3.2.2 ผลของปริมาณโปรตีนของเจลดินหลังจากการทำแห้งโดยใช้ตู้อบสุญญากาศในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชม.

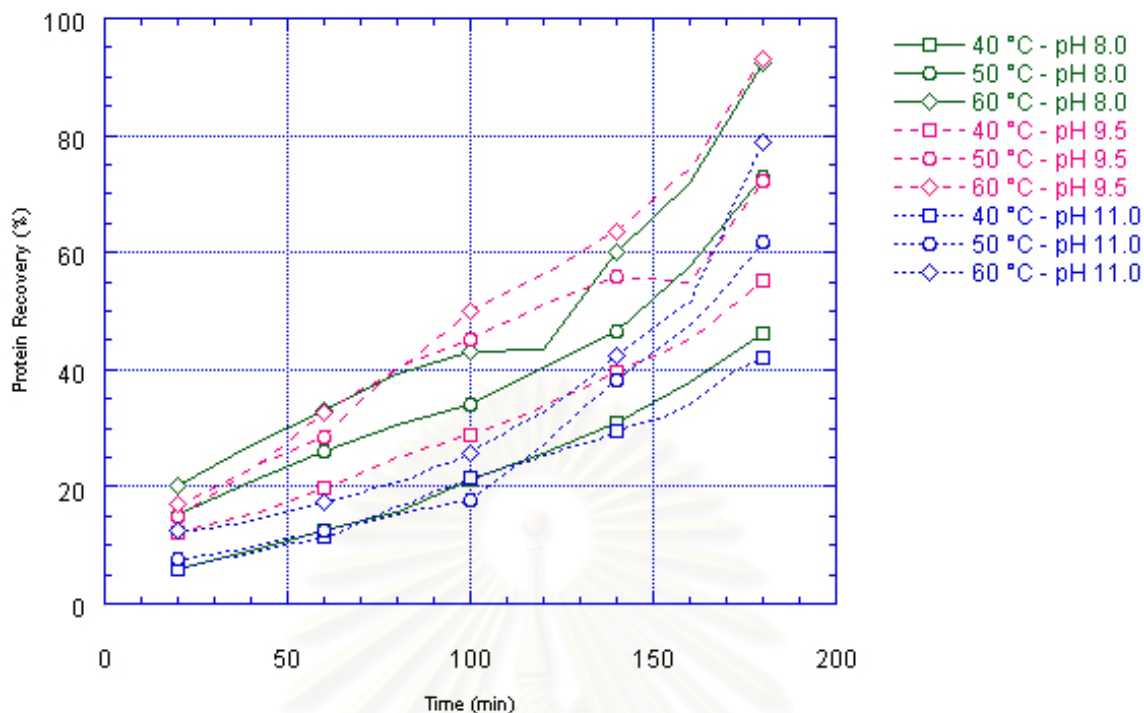
จากการทดลองหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's ผลของการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของเจลดินที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเจลดินเท่ากับ 200 U/mg พบว่าปริมาณโปรตีนจะมีค่าเพิ่มมากขึ้น เมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น และมีอุณหภูมิในการสกัดเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.13) ส่วนค่าของ pH ที่เหมาะสมในการทดลองที่ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ได้กลับคืนมามีค่าสูงอยู่ในช่วง pH 8.0- 9.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าของ pH ที่ใช้ในการทดลองที่เวลาและอุณหภูมิเดียวกันจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า ที่ pH 11.0 มีปริมาณของโปรตีนที่ได้กลับคืนมาน้อยที่สุด และคาดว่าปริมาณโปรตีนที่ได้กลับคืนมานี้เป็นผลเนื่องมาจากอุณหภูมิและสภาวะที่เป็นด่างเพราะที่ pH 11.0 นี้ เอนไซม์มีแอกติวิตีลดลงมามากเกินกว่าครึ่งหนึ่งแล้ว และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเป็น 5,000 U/mg และ 10,000 U/mg พบว่าปริมาณโปรตีนของเจลดินที่ได้กลับคืนมามีรูปแบบเหมือนกับที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg คือปริมาณโปรตีนจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.14 และ 4.15) โดยปริมาณโปรตีนที่ได้กลับคืนมาที่มีค่ามากที่สุดนั้นมีค่าประมาณ 93 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 180 นาที pH เท่ากับ 9.5 ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดคือ 10,000 U/mg (รูปที่ 4.15) ส่วนในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ในการสกัดนั้นผลที่ได้มีรูปแบบเหมือนกันกับการสกัดที่มีการใช้เอนไซม์ แต่ปริมาณโปรตีนของเจลดินที่ได้มีค่าน้อยกว่า (รูปที่ 4.16) และจากการเปรียบเทียบปริมาณเจลดินในรูปของน้ำหนักแห้งกับปริมาณโปรตีนที่ได้กลับคืนมา พบว่าปริมาณโปรตีนจะมีค่าแปรผันตามกับน้ำหนักของตัวอย่างเจลดินที่ได้ (รูปที่ 4.17) โดยเส้นกราฟมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเหมือนกัน แต่ปริมาณโปรตีนที่ได้มีค่าสูงกว่าและมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณน้ำหนักแห้งของเจลดินเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเจลดินที่ได้จะมีสารอินทรีย์อยู่ค่อนข้างน้อยลงหรือมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.17 (ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโปรตีนของเจลดินที่ได้กลับคืนมาเป็นเปอร์เซ็นต์แสดงในภาคผนวก ก)



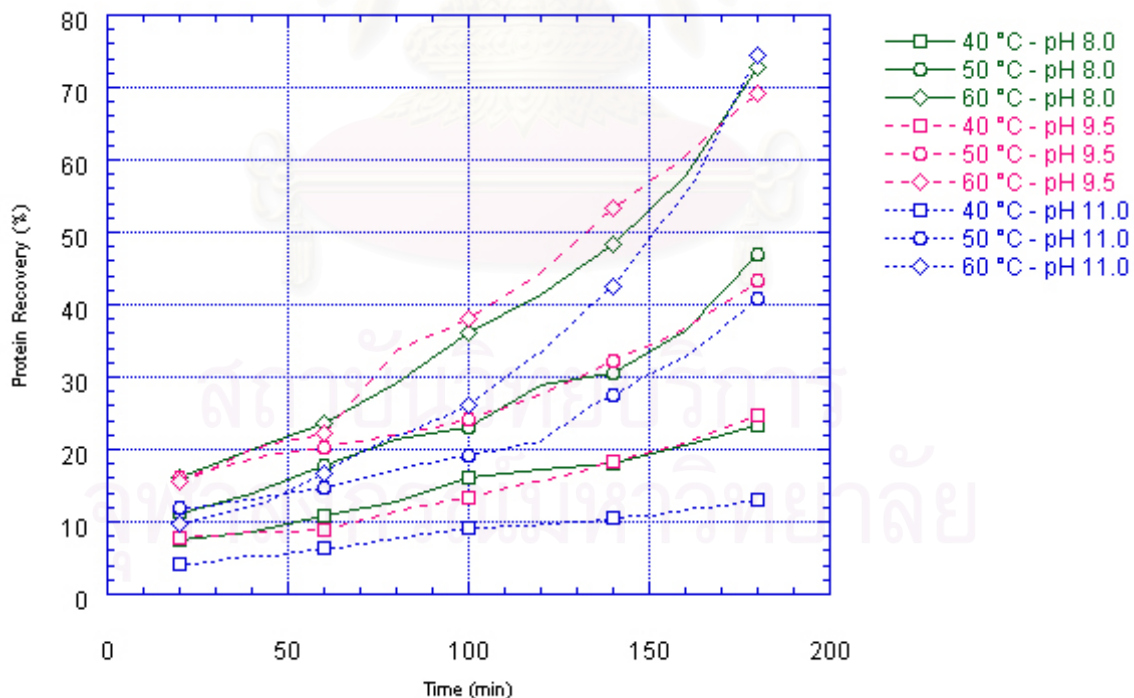
รูปที่ 4.13 ปริมาณ โปรตีนของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.9 ในภาคผนวก จ)



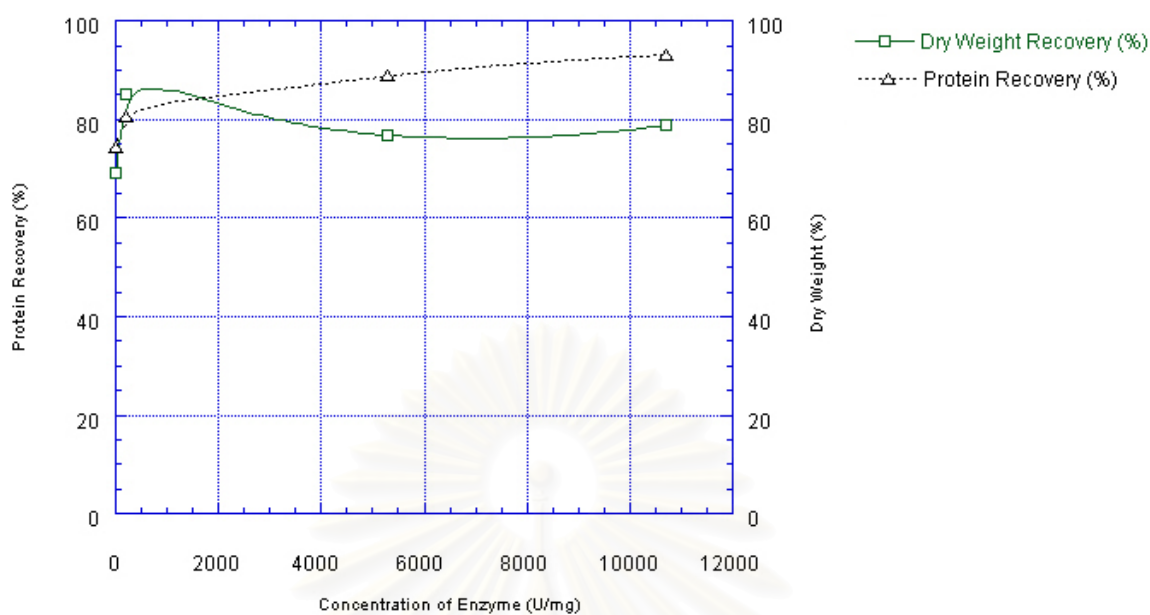
รูปที่ 4.14 ปริมาณ โปรตีนของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.10 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.15 ปริมาณโปรตีนของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.11 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.16 ปริมาณโปรตีนของเจลาตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช่เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.12 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.17 น้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีนของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ เอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.22 ในภาคผนวก จ)

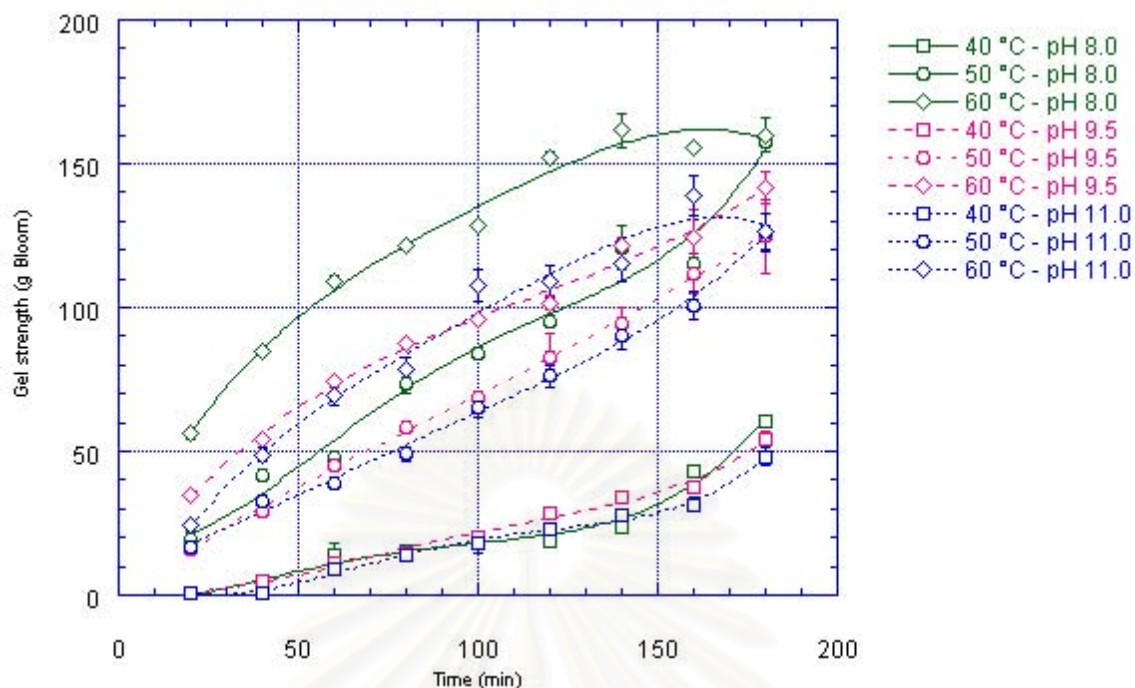
4.4 ศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของเจลละติน

ในการศึกษาสมบัติทางกายภาพของเจลละตินนั้น สมบัติที่สำคัญประการแรกที่จะใช้ในการแบ่งระดับของเจลละตินคือ ค่าความแข็งแรงของเจล รองลงมาคือ ความหนืด ดังนั้นในการทดลองจึงได้ทำการศึกษาสมบัติของสองข้อนี้เป็นหลัก แล้วนำผลที่ได้มาทำการประมวลผลด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ข้อมูล โดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) เพื่อหาความมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละปัจจัย และระหว่างปัจจัยของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของเจลละติน โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะที่ใช้สกัดกับสมบัติที่สำคัญของเจลละตินที่ได้ เพื่อทำนายค่าความแข็งแรงของเจลและความหนืดที่ได้จากการทดลองสกัดที่สภาวะต่าง ๆ โดยใช้ Multiple Regression

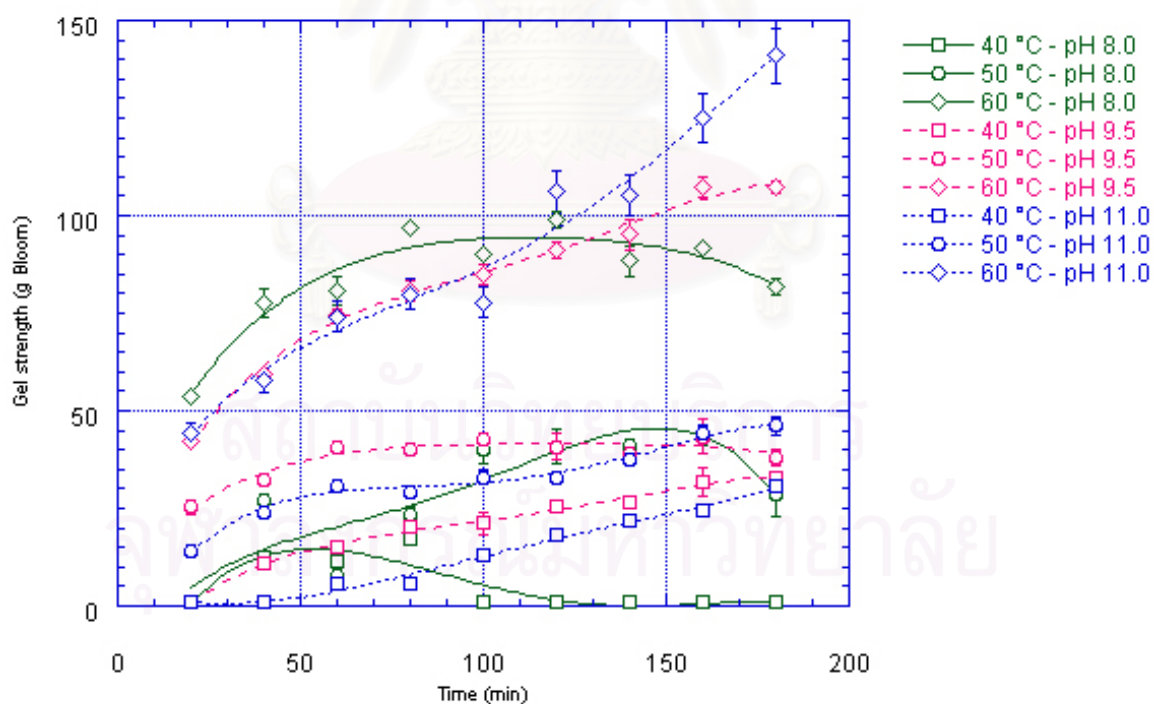
4.4.1 ผลของความแข็งแรงของเจล หรือ ค่าความแข็งแรงของเจล (Gel Strength)

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองวัดค่าความแข็งแรงของเจล เพื่อหาค่าความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเจลละตินเท่ากับ 200

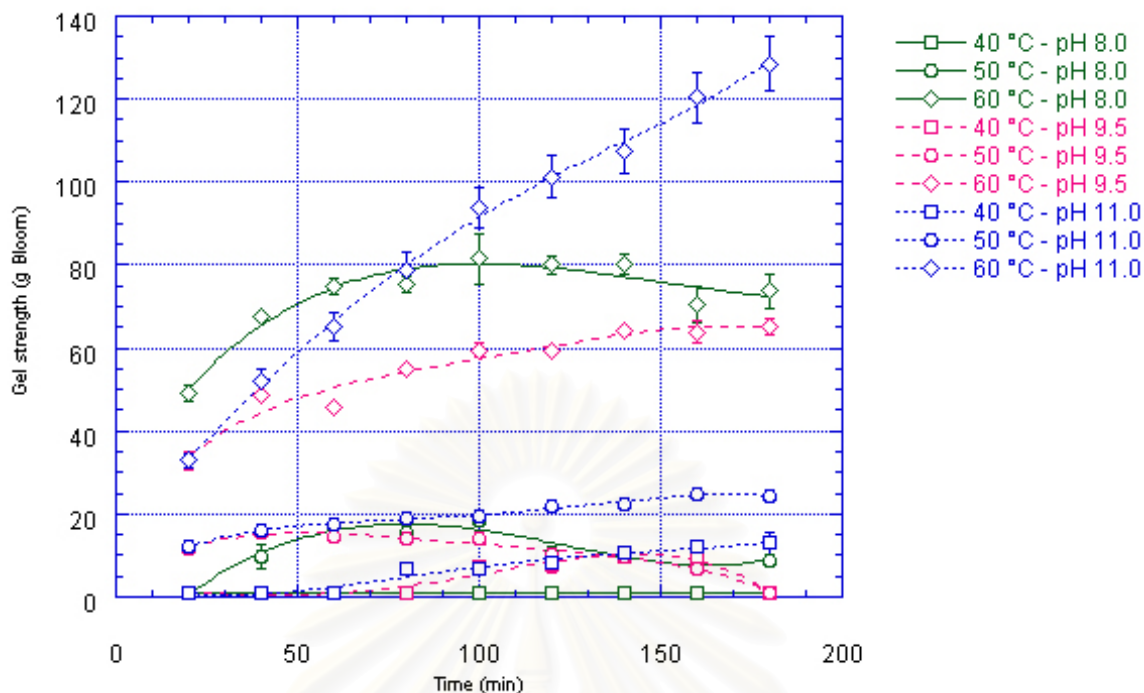
U/mg พบว่าค่าความแข็งแรงของเจลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.18) และจากผลการทดลองพบว่า ค่าความแข็งแรงของเจลที่ได้ยังแบ่งเป็นสองช่วงตามอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 40-50 องศาเซลเซียส จะมีค่าความแข็งแรงของเจล น้อยกว่า 60 g Bloom และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะมีค่าความแข็งแรงของเจลอยู่ในช่วง 16-160 g Bloom ซึ่งที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และทำให้ได้เจลดินที่มีความแข็งแรงของเจลสูงที่สุดด้วย เมื่อพิจารณาถึงค่าของ pH ที่เหมาะสมในการทดลองที่ทำให้ความแข็งแรงของเจลของเจลดินมีค่าสูงอยู่ในช่วง pH 8.0- 9.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าของ pH ที่ใช้ในการทดลองที่เวลาและอุณหภูมิเดียวกันจะเห็นได้ว่า ที่ pH 11.0 ค่าความแข็งแรงของเจลมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงกว่าการสกัดที่ pH 8.0 และ 9.5 ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 และ 10,000 U/mg คาดว่าเป็นผลเนื่องมาจากอุณหภูมิและสภาวะที่เป็นต่างเพราะที่ pH 11.0 นี้เอนไซม์มีการทำงานลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งแล้ว สายโพลีเปปไทด์ที่ถูกตัดให้สั้นลงจึงยังมีความยาวพอที่จะเกิดเจลที่มีความแข็งแรงได้ ดังนั้นเจลดินจึงยังคงมีค่าความแข็งแรงของเจลที่สูงอยู่ และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณของคอลลาเจนที่ถูกย่อยเป็นเจลดินก็มีเพิ่มขึ้นจึงทำให้ได้เจลดินที่มีความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น โดยค่าความแข็งแรงของเจลที่ได้จะมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 8.0 มีค่าความแข็งแรงของเจลเท่ากับ 160 g Bloom เมื่อพิจารณาที่เวลาที่ใช้ในการทดลองเดียวกัน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเป็น 5,000 U/mg และ 10,000 U/mg (รูปที่ 4.19 และ 4.20) พบว่าความแข็งแรงของเจลของเจลดินที่ได้กลับคืนมามีรูปแบบเหมือนกับที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg และความแข็งแรงของเจลจะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.26) นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส pH 8-9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเป็น 5,000 U/mg และ 10,000 U/mg พบว่า ความแข็งแรงของเจลมีแนวโน้มที่ลดต่ำลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากที่ความเข้มข้นของเอนไซม์สูง ๆ เอนไซม์มีปริมาณมากพอที่ย่อยสายโพลีเพปไทด์ของเจลดินให้สั้นลงมาก แต่ยังสามารถเกิดเจลได้ ทำให้ค่าความแข็งแรงของเจลที่วัดได้มีค่าต่ำ และเมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้นสายของโพลีเพปไทด์ยังสั้นลงจนเป็น โพรตีนชิ้นเล็ก ๆ (fragments) ที่ไม่สามารถเกิดเจลได้ เนื่องจากพันธะเพปไทด์ของเจลดินถูกตัดหรือย่อยให้สั้นลงในกระบวนการสกัด (Linus G. Fonkwe, 1997) ส่วนในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ในการสกัดนั้น (รูปที่ 4.21) ผลที่ได้มีรูปแบบเหมือนกับการสกัดที่มีการใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200 U/mg แต่ผลที่ได้มีค่าน้อยกว่า และเป็นผลเนื่องมาจากอุณหภูมิและสภาวะที่เป็นต่างในการสกัด



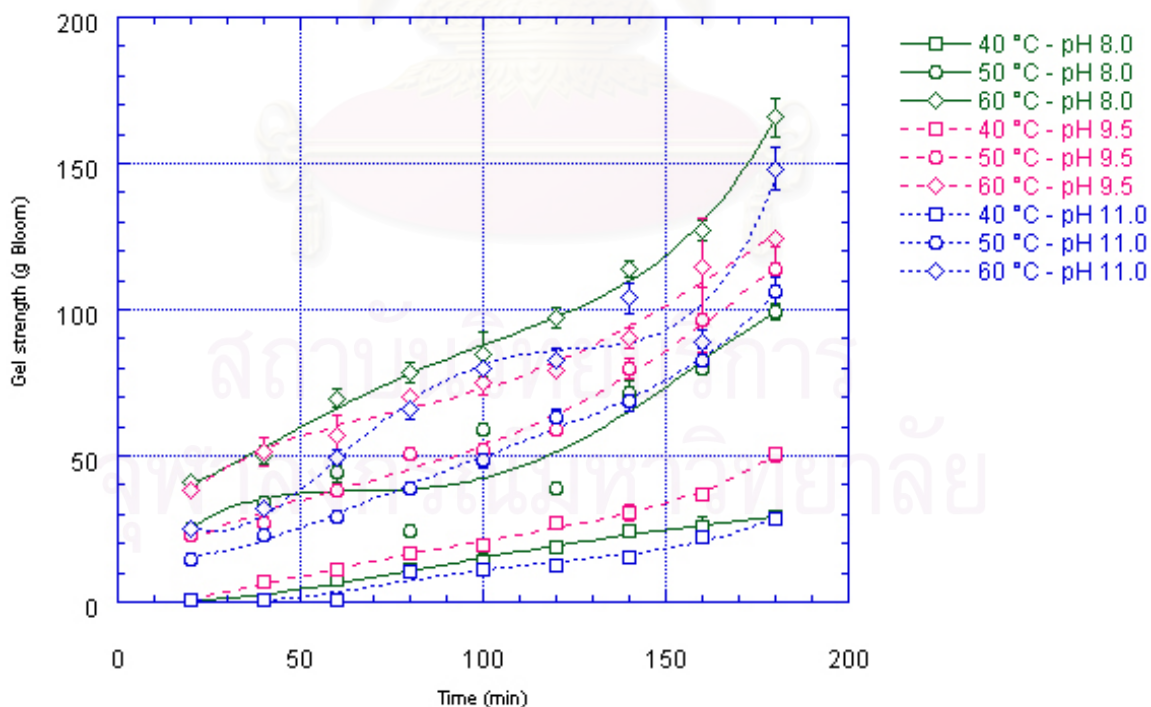
รูปที่ 4.18 ค่าความแข็งแรงของเจล ของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.13 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.19 ค่าความแข็งแรงของเจลของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.14 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.20 ค่าความแข็งแรงของเจลของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.15 ในภาคผนวก จ)

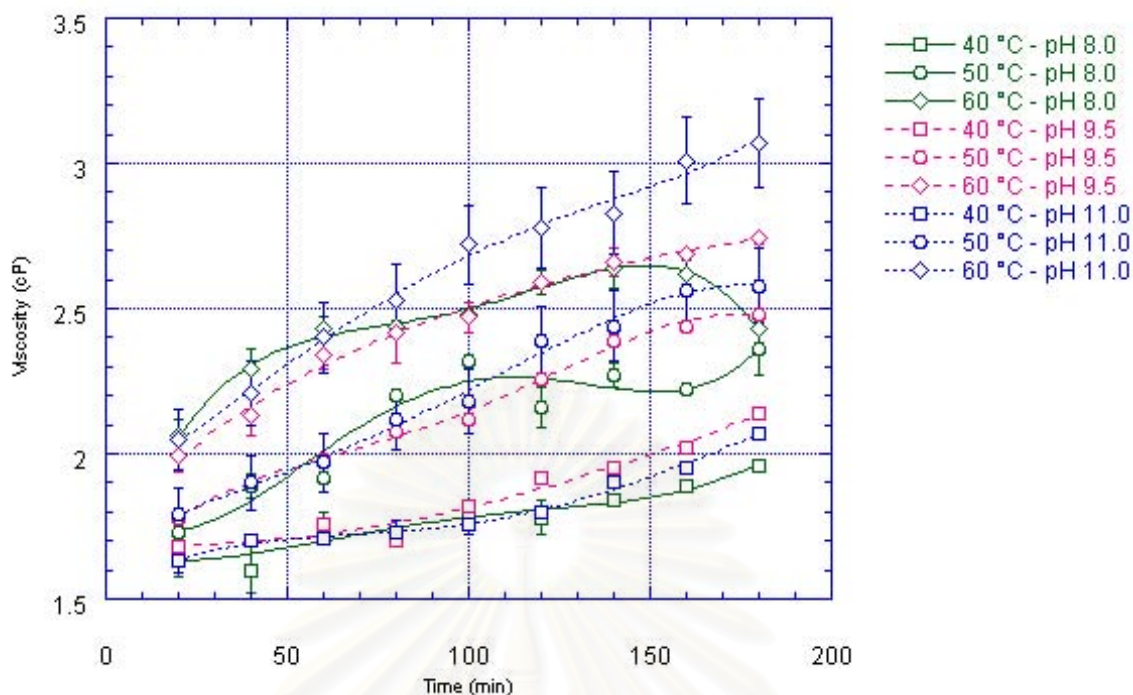


รูปที่ 4.21 ค่าความแข็งแรงของเจลของเจลาตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช่เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.16 ในภาคผนวก จ)

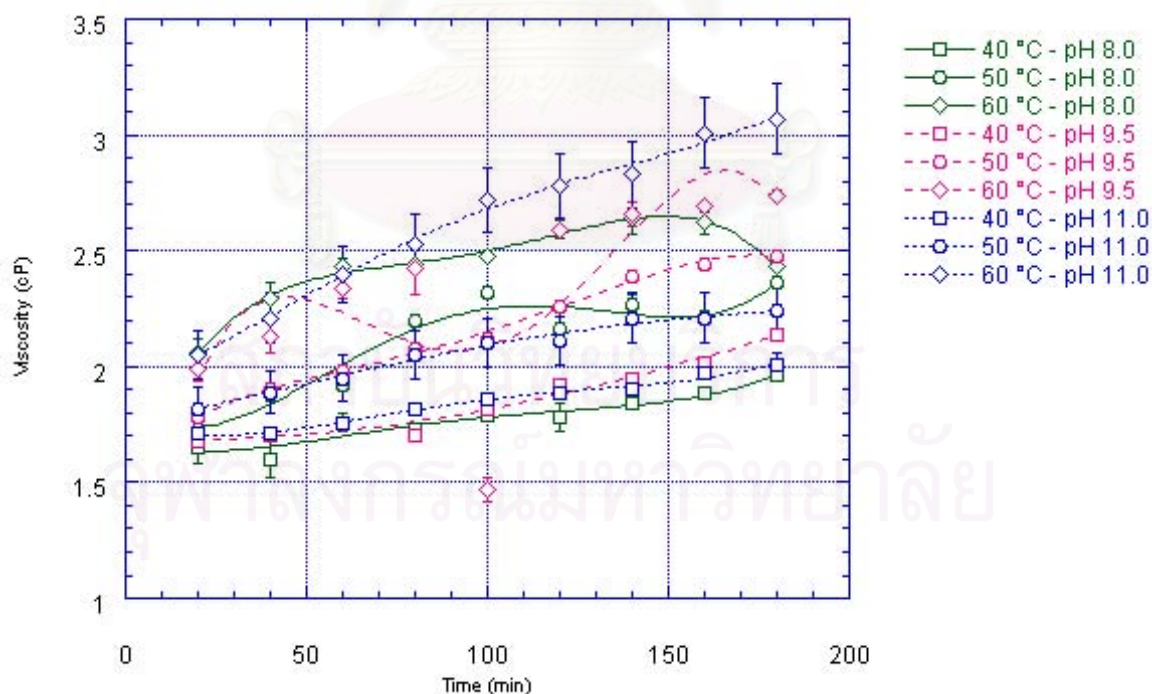
4.4.2 ผลของค่าความหนืด (Viscosity)

จากผลการทดลองวัดค่าความหนืดของเจล เพื่อหาค่าความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเจลดินเท่ากับ 200 U/mg พบว่า ความหนืดของเจลมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกับค่าความแข็งแรงของเจล (รูปที่ 4.26) คือเมื่อความแข็งแรงของเจลลดลง ความหนืดของเจลจะลดลงด้วย และเมื่อพิจารณาถึงผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองพบว่า ค่าความหนืดของเจลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับความแข็งแรงของเจล และจากผลการทดลองพบว่า ค่าความหนืดของเจลที่ได้ยังแบ่งเป็นสามกลุ่มตามอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาที่เวลาที่ใช้ในการทดลองเดียวกัน โดยในช่วงแรกที่อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส จะมีค่าความหนืดอยู่ในช่วง 1.63-2.14 cP ที่อุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส จะมีค่าความหนืดอยู่ในช่วง 1.73-2.58 cP และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะมีค่าความหนืดอยู่ในช่วง 1.99-3.07 cP ซึ่งที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และทำให้ได้เจลดินที่มีความหนืดสูงที่สุดด้วย เมื่อพิจารณาถึงผลของค่า pH ที่เหมาะสมในการทดลองที่ทำให้ความหนืดของเจลของเจลดินมีค่าสูงคือ pH 9.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าของ pH ที่ใช้ในการทดลองที่เวลาและอุณหภูมิเดียวกันจะเห็นได้ว่า ที่ pH 11.0 ค่าความแข็งแรงของเจลมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงกว่าการสกัดที่ pH 8.0 และ 9.5 คาดว่าเป็นผลเนื่องมาจากอุณหภูมิและสถานะที่เป็นต่างเช่นเดียวกับที่กล่าวไปแล้วในการวิเคราะห์ความแข็งแรงของเจล โดยค่าความหนืดที่วัดได้สูงสุด คือ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเจลดินเท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 11.0 ความหนืดของเจลมีค่าเท่ากับ 3.07 cP (รูปที่ 4.22) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเป็น 5,000 U/mg และ 10,000 U/mg (รูปที่ 4.23 และ 4.24) พบว่าความหนืดของเจลของเจลดินที่ได้กลับคืนมามีรูปแบบเหมือนกับที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg และความหนืดของเจลมีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.26) ส่วนในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ในการสกัดนั้นผลที่ได้มีรูปแบบเหมือนกับการสกัดที่มีการใช้เอนไซม์ และค่าความหนืดของเจลที่ได้มีใกล้เคียงกับเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg (รูปที่ 4.25) และเป็นผลเนื่องมาจากอุณหภูมิและสถานะที่เป็นต่างในการสกัด นอกจากนี้ค่าความหนืดของเจลดินจะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเจลดินเพิ่มขึ้น (Israelachvili, 1985)

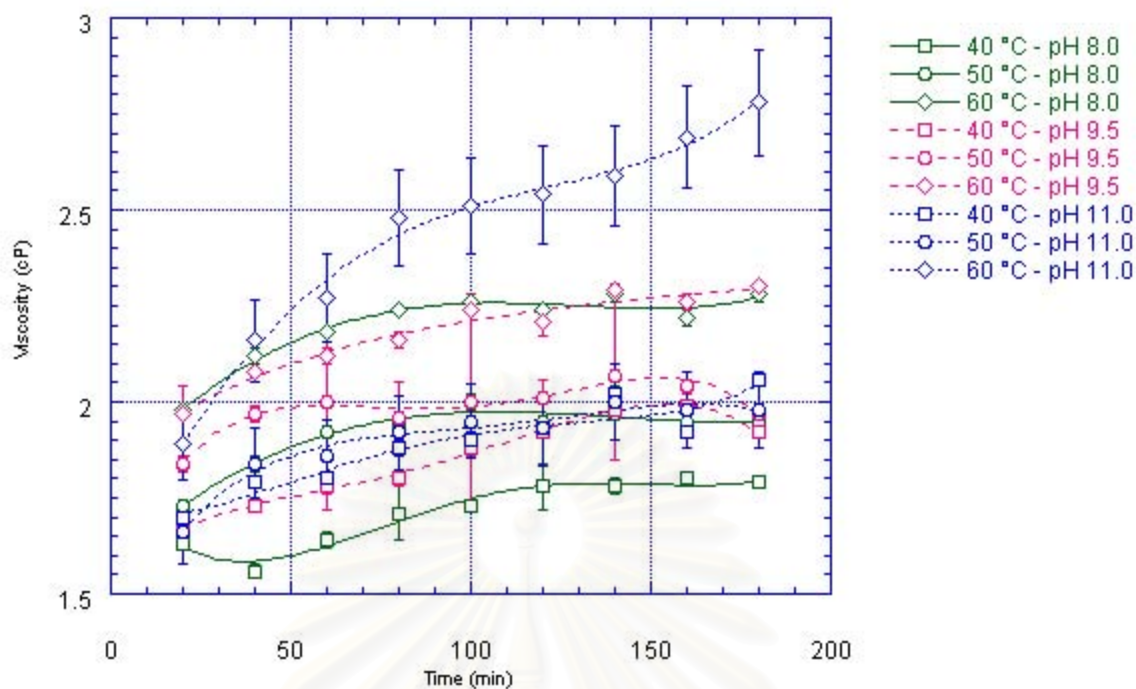
จากผลของค่าความแข็งแรงของเจลและความหนืดซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญที่ใช้ในการแบ่งระดับของเจลดินเพื่อนำมาใช้ในการอุตสาหกรรมต่าง ๆ พบว่าเจลดินที่ได้จากการทดลองนี้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ การผลิตไวน์ เบียร์ น้ำผลไม้ ลูกกวาด วาฟเฟิล อุตสาหกรรมยา ได้แก่ การผลิตแคปซูลชนิดอ่อน และการผลิตยาเม็ด ซึ่งจะใช้เจลดินที่มีค่าความแข็งแรงของเจลในช่วง 50-200 g Bloom และความหนืดในช่วง 1.7-4.5 cP.



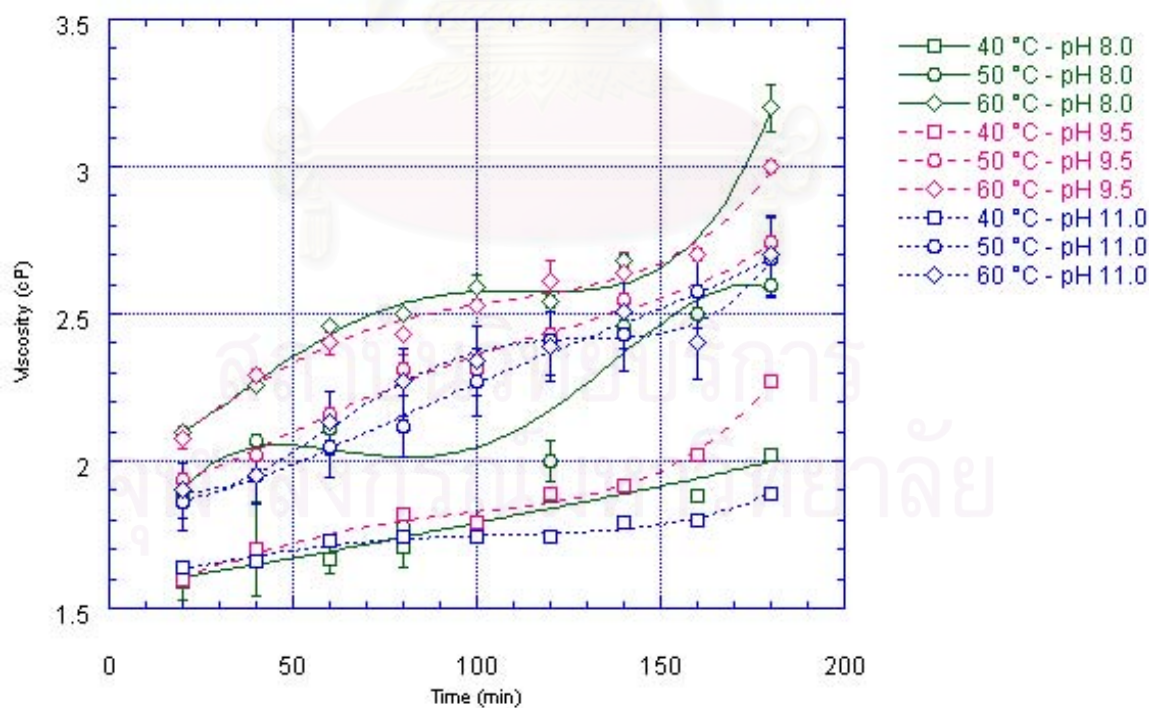
รูปที่ 4.22 ความหนืดของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.17 ในภาคผนวก จ)



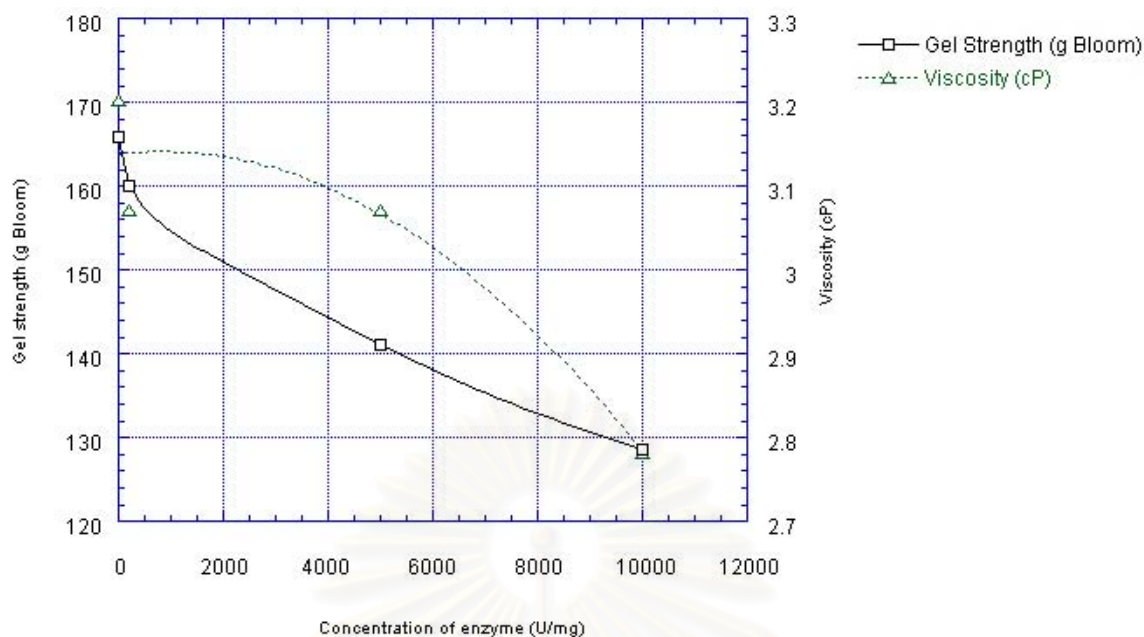
รูปที่ 4.23 ความหนืดของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่ เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.18 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.24 ความหนืด ของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.19 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.25 ความหนืดของเจลาตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.20 ในภาคผนวก จ)



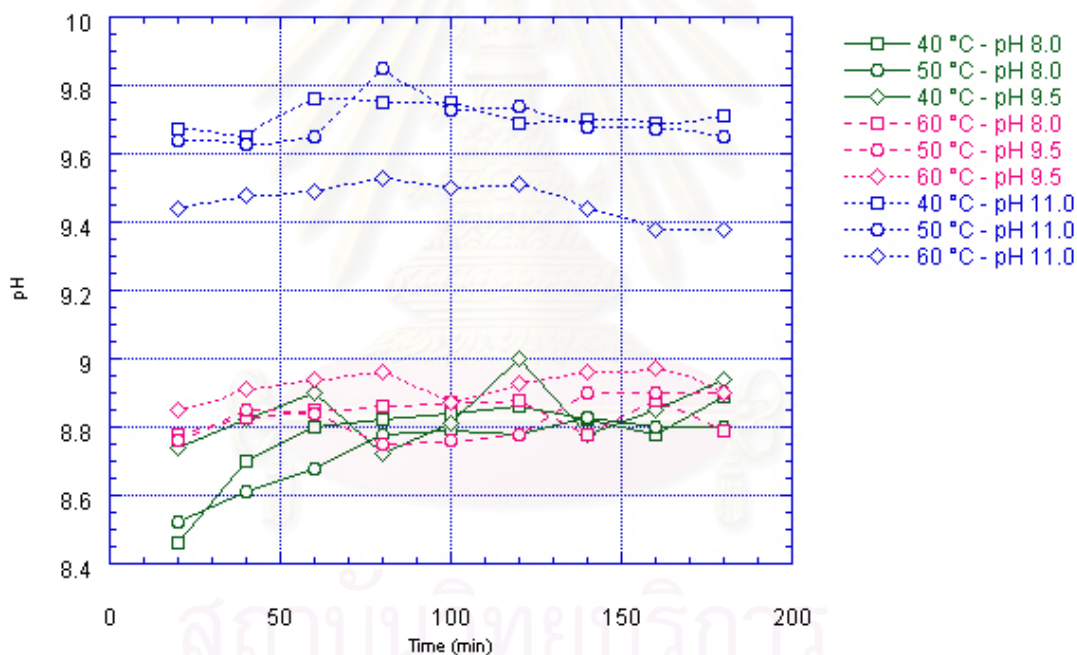
รูปที่ 4.26 ค่าความแข็งแรงแรงเจลและความหนืดเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ เอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส(ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.22 ในภาคผนวก จ)

4.4.3 ศึกษาสมบัติการละลายของเจละติน

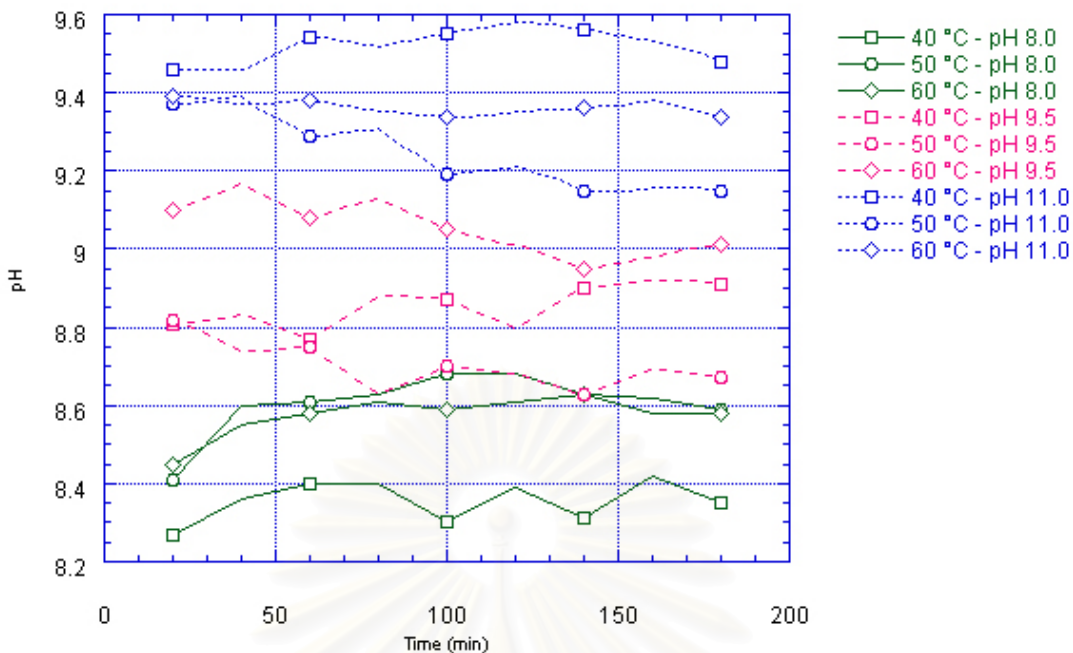
จากการศึกษาสมบัติการละลายของเจละตินพบว่า เมื่อนำเจละตินมาละลายน้ำ เจละตินสามารถละลายได้ในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถละลายได้ในน้ำเย็น แต่จะเกิดการพองตัว อ่อนนุ่ม และสามารถอุ้มน้ำได้ และไม่สามารถละลายได้ใน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และ 95 % เอทานอล การละลายของเจละตินนั้นเป็นผลมาจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจละตินที่มีขั้ว ได้แก่ กรดอะมิโนที่เป็นกรด (acidic amino acid) คือ กรดแอสพาทิค (aspartic acid), กรดกลูตามิก (glutamic acid), ไทโรซีน (tyrosine) และ ซิสเตอีน (cysteine) กรดอะมิโนที่เป็นเบส (basic amino acid) ได้แก่ อาร์จินีน (arginine), ฮิสทีดีน (histidine) และ ไลซีน (lysine) กรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylated amino acid) ได้แก่ ไฮดรอกซีไลซีน (hydroxylysine) และ ไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ซึ่งจะทำให้เจละตินสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้ว (Aristippos Gennadios, 2002)

4.4.4 ศึกษาถึงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายเจละดินที่ได้จากการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

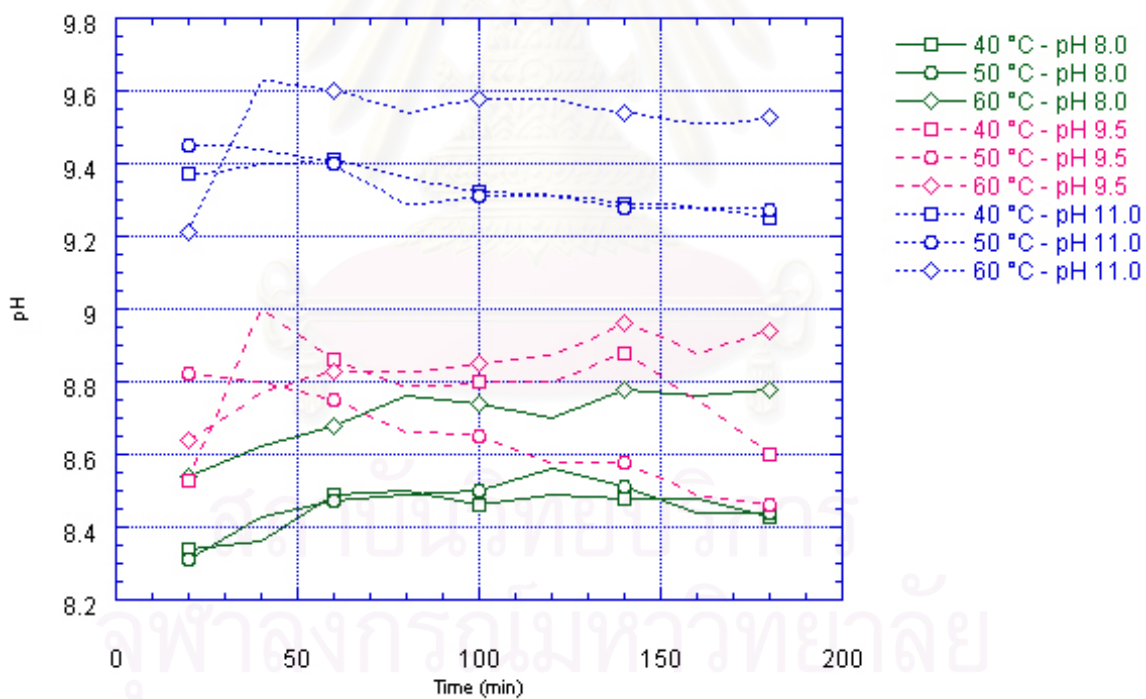
ศึกษาค่า pH ของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองในข้อ 4.3.2 โดยใช้สารละลายเจละดินเข้มข้น 1 % โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าจากผลการทดลองทำให้สามารถแบ่งค่า pH ของตัวอย่างสารละลายเจละดินได้ออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกมีค่า pH อยู่ในช่วง 9.0-9.8 เป็นเจละดินที่ได้จากการสกัดโดยใช้ค่า pH ของบัฟเฟอร์ขณะสกัดเท่ากับ pH 11.0 และช่วงที่ 2 pH อยู่ในช่วง 8.0-9.0 เป็นเจละดินที่ได้จากการสกัดโดยใช้ค่า pH ของบัฟเฟอร์ขณะสกัดเท่ากับ pH 8.0 และ 9.5 โดยค่าของ pH ของสารละลายเจละดินไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัด (ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 4.27-4.30) และจากการพิจารณาพบว่าค่า pH ของสารละลายเจละดินที่ได้จะมีค่าต่ำกว่าค่าของ pH ที่ใช้ในการสกัดประมาณ 0.5-1.0



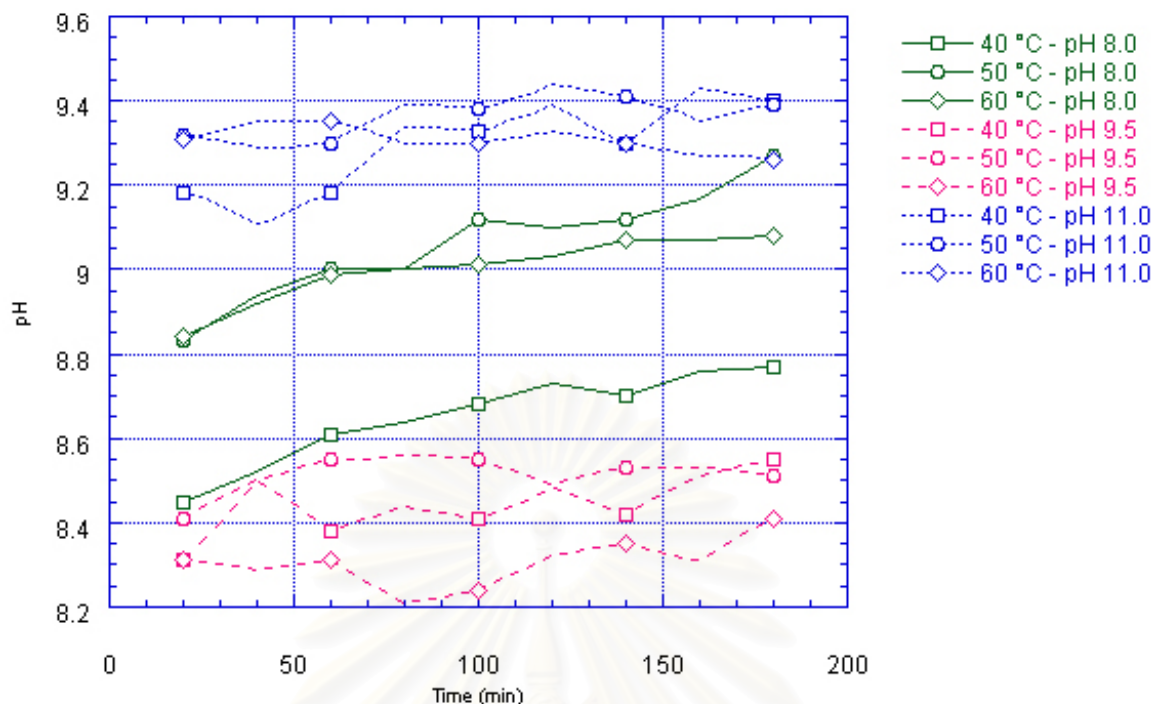
รูปที่ 4.27 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.23 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.28 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.24 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.29 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.25 ในภาคผนวก จ)

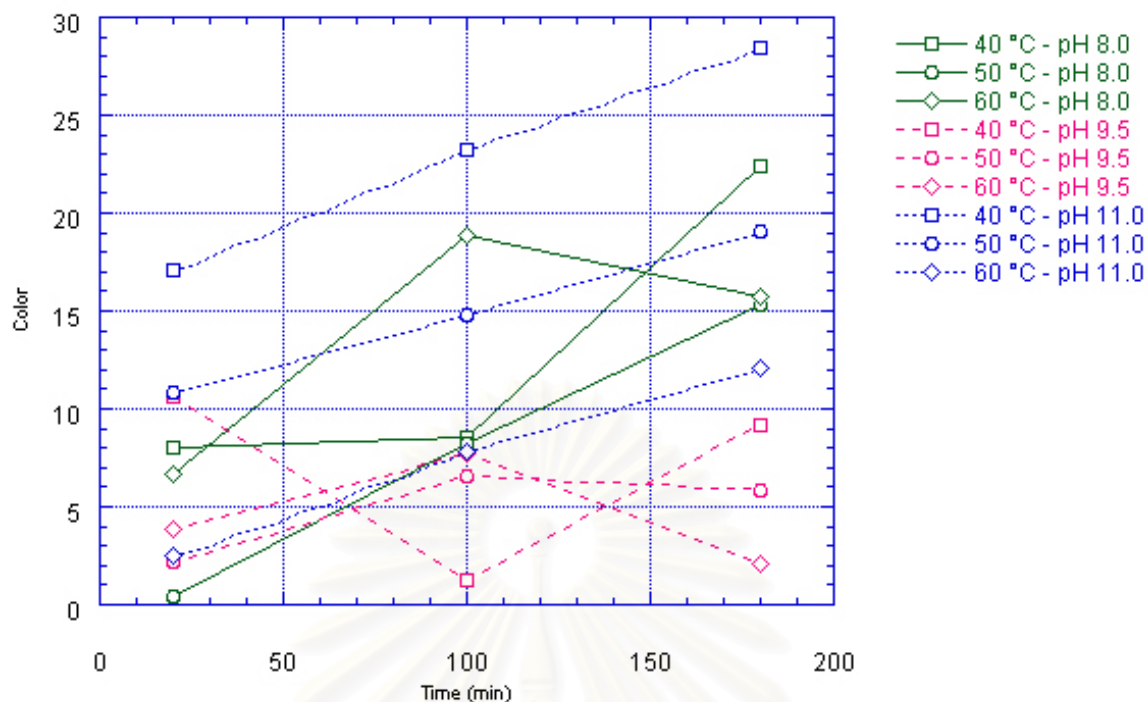


รูปที่ 4.30 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.26 ในภาคผนวก จ)

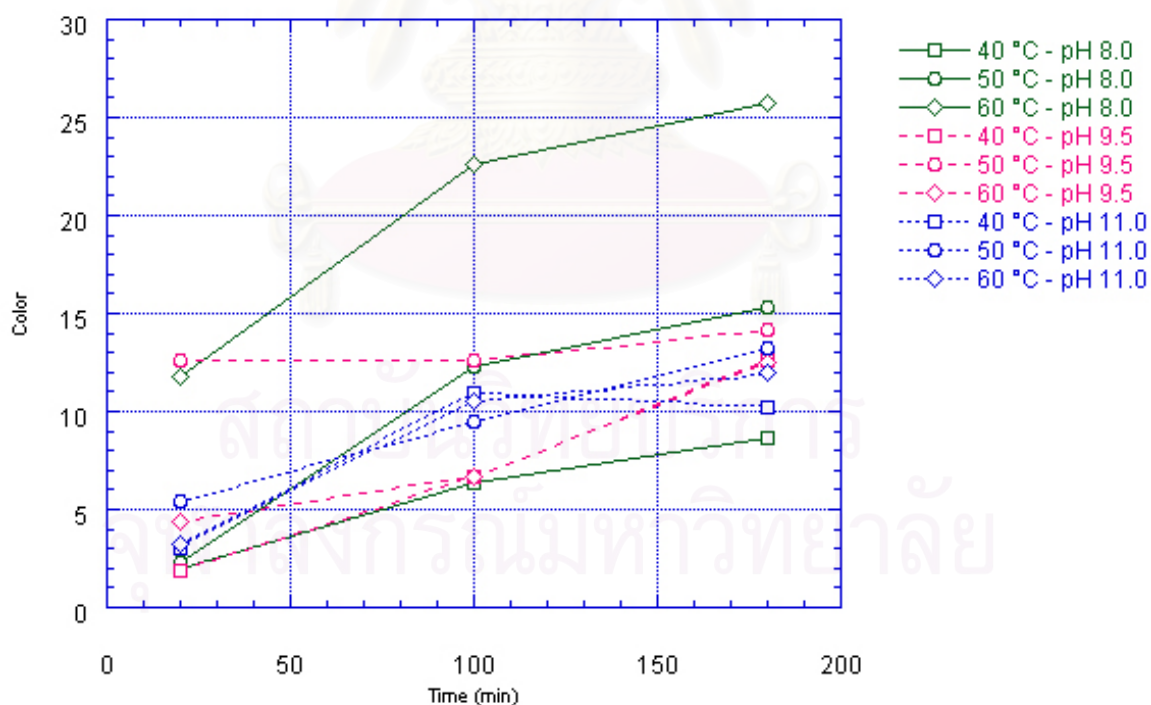
4.4.5 ศึกษาถึงสีของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

ผลของสีของเจลละตินหลังจากการทำแห้งโดยใช้ตู้อบสูญญากาศ (Vacuum drying oven) ในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชม. จากการนำเจลละตินที่ได้ไปทำการวัดค่าของสีโดยใช้ เครื่องวัดสี (Spectrocolorimeter) โดยใช้ระบบสี Lab แล้วนำผลที่มากำหนดค่าเดลต้าอี (ΔE) เพื่อดูแนวโน้มของสีของเจลละตินที่ทำการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ โดยใช้เจลละตินที่มีความบริสุทธิ์สูงเป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐานในการทดลอง

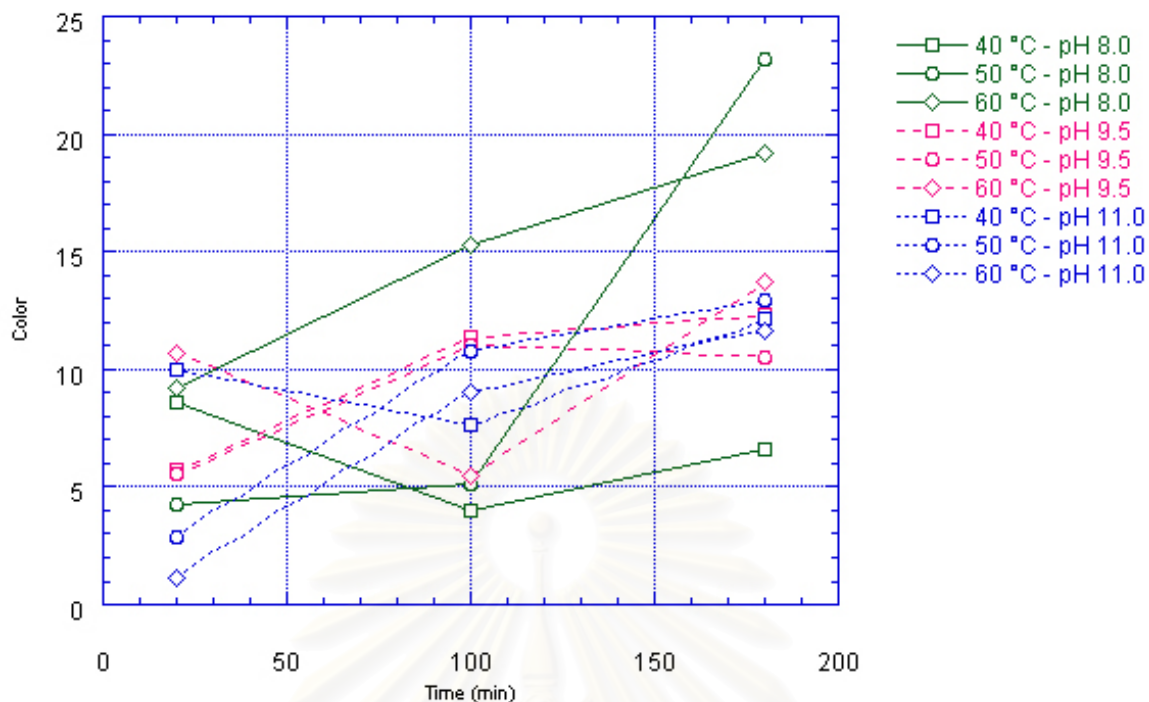
จากผลการทดลองพบว่า ค่าเดลต้าอีที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และ ค่า pH ที่ใช้ในการสกัด (รูปที่ 4.31-4.34) แสดงให้เห็นว่าสีของเจลละตินที่ได้จากการสกัดจะขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ โดยสีของเจลละตินจะเข้มขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดนานขึ้น เนื่องจากมีการปนเปื้อนของสาร โปรตีนอื่นที่ออกมาจากเศษหนังเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ความโปร่งใสของเจลละตินที่ได้ก็ลดลงเช่นเดียวกันเมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น (Rainville et al., 2000) และจากการทดลองพบว่าสมบัติของเจลละตินไม่ขึ้นอยู่กับสีของเจลละติน (Mrak และ Stewart, 1957 และ Kirk -Othmer, 1966,1978)



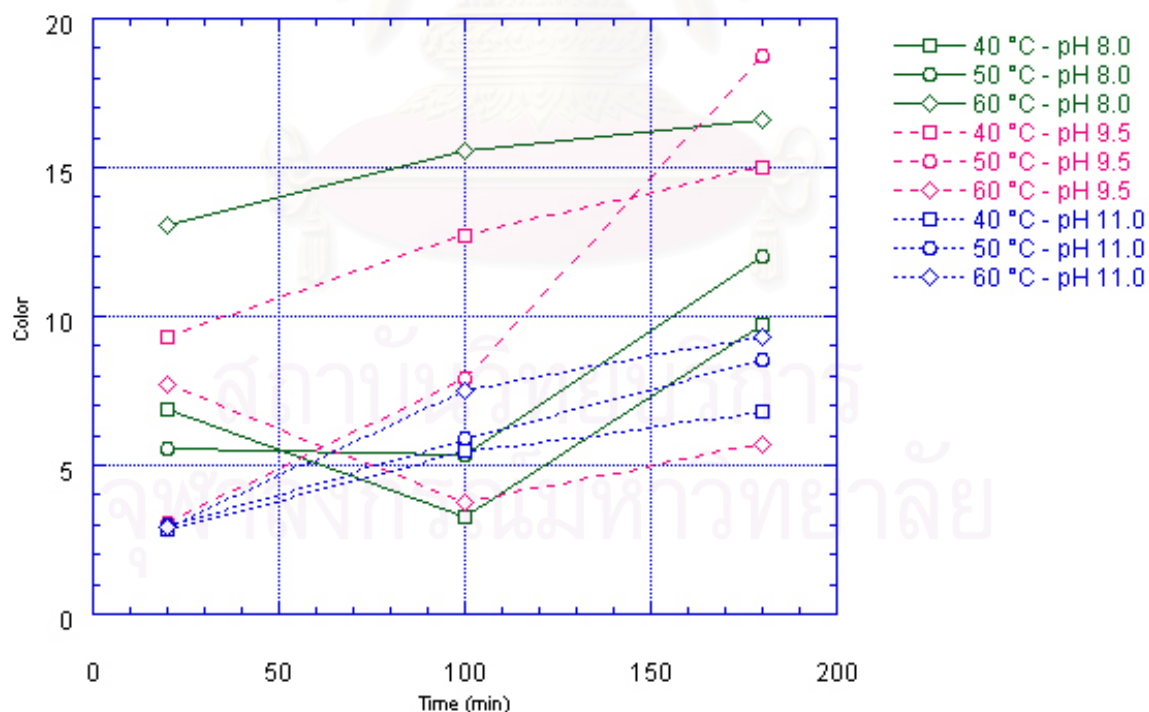
รูปที่ 4.31 ค่าสีของเจลดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.27 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.32 ค่าสีของเจลดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.28 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.33 ค่าสีของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.29 ในภาคผนวก จ)



รูปที่ 4.34 ค่าสีของเจละดินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.30 ในภาคผนวก จ)

4.4.6 ศึกษาปริมาณ สารหนู ตะกั่ว โลหะหนัก และ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในเจละดินที่สกัดได้

จากการวัดปริมาณธาตุในตัวอย่างเจละดินและหนังเปือกที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดเจละดิน โดยใช้ ICP atomic emission spectrometry ซึ่งสามารถวัดปริมาณธาตุได้ถึงระดับ ppm โดยทำการสุ่มตัวอย่างเจละดินที่ได้จากการสกัดแล้วส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณธาตุ ได้แก่ สารหนู ทองแดง สังกะสี ตะกั่ว และ ซัลเฟอร์ พบว่า ปริมาณธาตุที่พบในเจละดิน และตัวอย่างหนังเปือกมีปริมาณน้อยกว่าที่มาตรฐานอุตสาหกรรมเจละดินที่กำหนดไว้ (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4. 2) และจากผลการทดลองจะพบว่าปริมาณธาตุในเจละดินมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากเดิมที่อยู่ในตัวอย่างหนังเปือก ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากการปนเปื้อนในขั้นตอนการสกัด การอบแห้ง และการเก็บรักษา

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณธาตุที่พบในเจละดินที่สกัดได้เปรียบเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.)

ตัวอย่าง	ปริมาณธาตุ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)*				
	สารหนู (As)	ทองแดง (Cu)	สังกะสี (Zn)	ตะกั่ว (Pb)	ซัลเฟอร์ (S)
มอก.	1	30	100	5	40
หนังเปือกเริ่มต้น	<0.05	0.008	0.499	<0.04	11.33
pH 9.5, no enz, 60°C, 140 min	<0.05	0.016	0.460	<0.04	15.34
pH 9.5, 200 U/mg, 40°C, 140 min	<0.05	0.011	0.813	<0.04	12.73
pH 9.5, 10,000 U/mg, 60°C, 140 min	<0.05	0.010	0.345	<0.04	18.47

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

4.4.7 ศึกษาปริมาณความชื้น (Moisture content)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4. 3 ได้ทำการสุ่มตัวอย่างเจละดินที่ได้จากการสกัด และมีอายุในการเก็บรักษา 1 ปี ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ได้ควบคุมความชื้น มาทำการวัดหาปริมาณความชื้น พบว่าปริมาณความชื้นที่วัดได้จากตัวอย่างเจละดินมีค่าประมาณ 17-19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่าที่มาตรฐานอุตสาหกรรมเจละดินกำหนดไว้เล็กน้อย คือ 16 เปอร์เซ็นต์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารและยา ซึ่งค่าความชื้นในเจละดินจะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บรักษาและอายุของเจละดิน

ตารางที่ 4.3 ปริมาณความชื้นที่พบในตัวอย่างหนังเปือก และ เจลละติน

ตัวอย่าง*	ความชื้น** (เปอร์เซ็นต์)
มอก.	16.00
เจลละติน no enzyme, 60 °C, 180 min, pH 9.5	19.14
เจลละติน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 8.0	17.66
เจลละติน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 9.5	17.31
เจลละติน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 11.0	19.70

* ตัวอย่างเจลละตินที่ใช้ทดลองมีอายุการเก็บ 1 ปี ที่อุณหภูมิต่ำ

** ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ครั้ง

4.4.8 ศึกษาปริมาณเถ้า (Ash Content)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4. 4 ได้ทำการสุ่มตัวอย่างเจลละตินที่ได้จากการสกัด และมีอายุในการเก็บรักษา 1 ปี ที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่ได้ควบคุมความชื้น มาทำการวัดหาปริมาณเถ้าพบว่า ปริมาณเถ้าที่วัดได้จากตัวอย่างเจลละตินมีค่าประมาณ 27-30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเกินกว่าที่มาตรฐานอุตสาหกรรมเจลละตินกำหนดไว้มากคือ 0.18 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอุตสาหกรรมอาหารและยา ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากความไม่บริสุทธิ์ของตัวอย่างเจลละติน ซึ่งถ้าตัวอย่างเจลละตินเหล่านี้ไปผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนแล้วคาดว่าปริมาณของเถ้าจะมีค่าลดลง ดังจะเห็นได้จากปริมาณเถ้าของเจลละตินมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูงที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (ผลการทดลองแสดงในภาคผนวก ก) มีปริมาณเถ้าเพียง 0.22 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเถ้าที่พบในตัวอย่างหนังเปือก และ เจลละติน

ตัวอย่าง*	เถ้า** (เปอร์เซ็นต์)
มอก.	0.18
เจลละตินมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง	0.22
เจลละติน no enzyme, 60 °C, 180 min, pH 9.5	30.11
เจลละติน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 8.0	27.44
เจลละติน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 9.5	27.40
เจลละติน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 11.0	28.09

* ตัวอย่างเจลละตินที่ใช้ทดลองมีอายุการเก็บ 1 ปี ที่อุณหภูมิห้อง

** ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ครั้ง

4.4.9 ศึกษาไขมัน (%Fat)

เมื่อทำการสุ่มตัวอย่างเจลละตินที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์ Savinase 12T ที่มีอายุในการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ได้ควบคุมความชื้น มาทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้วิธี Soxhlet เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าปริมาณไขมันที่วัดได้จากตัวอย่างเจลละตินมีค่าอยู่ในช่วง 0.13-0.99 เปอร์เซ็นต์ (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4. 5) เมื่อพิจารณาถึงผลของความเข้มข้นของเอนไซม์พบว่าปริมาณของไขมันจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น ที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกันที่ใช้ในการสกัด และเมื่อพิจารณาถึงผลของค่า pH ที่ใช้ในการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากัน พบว่าค่าของ pH ที่ทำให้เจลละตินมีปริมาณไขมันเหลืออยู่น้อยที่สุดคือที่ pH 9.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้เพิ่มขึ้น และมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ๆ จึงมีประสิทธิภาพมากพอที่จะเข้าไปย่อยสายของโพลีเพปไทด์ให้สั้นลง จึงมีปริมาณของไขมันที่อยู่ในหรือติดกับ โมเลกุลของโปรตีนในหนังเปือกหลุดออกมาได้มากขึ้น ดังนั้นเจลละตินที่ได้จึงมีปริมาณของไขมันลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในหัวข้อ 4.3.2.2 รูปที่ 4.17 กล่าวคือปริมาณโปรตีนที่ได้จะมีค่าสูงกว่าปริมาณน้ำหนักแห้งของเจลละตินและมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเจลละตินที่ได้จะมีสารอื่นปนอยู่น้อยลง (เช่น ไขมัน) หรือมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของไขมันที่วิเคราะห์ได้จากเจลละตินมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูงที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมยากับเจลละตินที่ได้จากการสกัดในการทดลองนี้

พบว่าเถ้าดินที่ได้จากการสกัดในการทดลองมีปริมาณของไขมันที่น้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้ ปริมาณไขมันในเถ้าดินจะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัด วิธีการและกระบวนการที่ใช้ในการสกัดเป็นสำคัญ

ตารางที่ 4.5 ปริมาณไขมันที่พบในเถ้าดินที่สกัดได้

ตัวอย่าง	ไขมัน*(เปอร์เซ็นต์)
เถ้าดินมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง	1.54
เถ้าดิน no enzyme, 60 °C, 180 min, pH 9.5	0.99
เถ้าดิน [enz.] 200 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 9.5	0.69
เถ้าดิน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 8.0	0.40
เถ้าดิน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 11.0	0.20
เถ้าดิน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 9.5	0.16
เถ้าดิน [enz.] 10,000 U/mg, 60 °C, 180 min, pH 9.5	0.13

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ครั้ง

4.4.10 ศึกษาการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

จากผลการทดลองในตารางที่ 4. 6 ได้ทำการสุ่มตัวอย่างเถ้าดินที่ได้จากการสกัดแล้ว วิเคราะห์เพื่อตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ที่พบในเถ้าดินที่สกัดได้เปรียบเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรม พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในเถ้าดิน มีปริมาณน้อยกว่าที่มาตรฐานอุตสาหกรรมเถ้าดินที่กำหนดไว้ หลังจากมีอายุในการเก็บรักษา 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ได้ควบคุมความชื้น และจากการตรวจสอบพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด ซึ่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นี้คาดว่าน่าจะมาจากการวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างของเถ้าดิน เพราะในขั้นตอนการสกัดได้มีการผ่านการฆ่าเชื้อมาระดับหนึ่งแล้วที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในขั้นตอนของการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ และการอบแห้งตัวอย่างเถ้าดินที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.6 จำนวนจุลินทรีย์ที่พบในเจลดินที่สกัดได้เปรียบเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.)

ตัวอย่าง	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด* (โคโลนีต่อกรัม)
มอก.	10^3
เจลดิน no enzyme, 40 °C,40 min, pH 11.0	17
เจลดิน no enzyme, 40 °C,160 min, pH 11.0	15
เจลดิน [enz.] 5,000 U/mg, 60 °C,180 min, pH 9.5	21
เจลดิน [enz.] 10,000 U/mg, 50 °C, 140 min, pH 8.0	19

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

4.5 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

4.5.1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ เวลา และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการสกัดต่อสมบัติที่สำคัญของเจลดิน (ค่าความแข็งแรงของเจลและความหนืด)

ผลของการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) โดยใช้ SPSS.13 เพื่อหานัยสำคัญทางสถิติของแต่ละปัจจัย และระหว่างปัจจัยของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของเจลดิน คือ ค่าความแข็งแรงของเจล(ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.13-จ.16 ในภาคผนวก จ) และความหนืด (ข้อมูลการทดลองแสดงดังตารางที่ จ.17-จ.20 ในภาคผนวก จ) โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลา อุณหภูมิ pH และอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งหมด มีผลต่อค่าความแข็งแรงของเจลที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.7) จากตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่า ค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเพิ่มขึ้น ในตารางที่ 4.9 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง ค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลที่ได้จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลมากที่สุดคือ 200 U/mg ในตารางที่ 4.10 จะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง ค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และจากตารางที่ 4.11 พบว่าค่าของ pH มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลแบ่งได้เป็น 3 ช่วง และไม่มีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความแข็งแรงของเจลเนื่องจาก ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลา อุณหภูมิ และ pH ในกระบวนการสกัด

Dependent Variable: gel

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1056994.004(a)	323	3272.427	364.588	.000
Intercept	1470841.176	1	1470841.176	163869.627	.000
time	186078.529	8	23259.816	2591.427	.000
enzyme	109841.139	3	36613.713	4079.214	.000
temp	560498.749	2	280249.375	31223.195	.000
pH	1115.720	2	557.860	62.152	.000
time * enzyme	58576.223	24	2440.676	271.921	.000
time * temp	30316.799	16	1894.800	211.104	.000
enzyme * temp	35737.511	6	5956.252	663.599	.000
time * enzyme * temp	14780.597	48	307.929	34.307	.000
time * pH	3990.936	16	249.434	27.790	.000
enzyme * pH	18459.681	6	3076.613	342.772	.000
time * enzyme * pH	7520.247	48	156.672	17.455	.000
temp * pH	10513.954	4	2628.488	292.846	.000
time * temp * pH	5403.386	32	168.856	18.813	.000
enzyme * temp * pH	5035.871	12	419.656	46.755	.000
time * enzyme * temp * pH	9124.663	96	95.049	10.590	.000
Error	2908.120	324	8.976		
Total	2530743.300	648			
Corrected Total	1059902.124	647			

a R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .995)

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเจลาติน

gel

Duncan

time	N	Subset*								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	72	18.5306								
2.00	72		28.9056							
3.00	72			36.3250						
4.00	72				42.7958					
5.00	72					48.8181				
6.00	72						53.4167			
7.00	72							59.7694		
8.00	72								65.4847	
9.00	72									74.7375
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 8.976.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 72.000.

b Alpha = .05.

* ชั้นเซท (Subset) ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่า ค่านั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยที่ time 1 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 20 นาที
time 2 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 40 นาที
time 3 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 60 นาที
time 4 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 80 นาที
time 5 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 100 นาที
time 6 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 120 นาที
time 7 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 140 นาที
time 8 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 160 นาที
time 9 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 180 นาที

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัด
เจลาติน

gel

Duncan

enzyme	N	Subset*			
		1	2	3	4
4.00	162	29.8074			
3.00	162		43.9253		
1.00	162			50.8735	
2.00	162				65.9642
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 8.976.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 162.000.

b Alpha = .05.

* ซับเซต (Subset) ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่า ค่านั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความ
เชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยที่ enzyme 1 คือ ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์

enzyme 2 คือ ชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 200 U/mg

enzyme 3 คือ ชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 5,000 U/mg

enzyme 4 คือ ชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 10,000 U/mg

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเจลละติน

gel

Duncan

temp	N	Subset*		
		1	2	3
1.00	216	13.6769		
2.00	216		43.8361	
3.00	216			85.4148
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 8.976.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 216.000.

b Alpha = .05.

* ซับเซท (Subset) ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่า ค่านั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยที่ temp 1 คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

temp 2 คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส

temp 3 คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.11 ค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลที่ pH ต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเจลละดิน

gel

Duncan

pH	N	Subset*		
		1	2	3
2.00	216	46.3838		
3.00	216		47.0912	
1.00	216			49.4528
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 8.976.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 216.000.

b Alpha = .05.

* ซับเซต (Subset) ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่า ค่านั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยที่ pH 1 คือ pH ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 8.0

pH 2 คือ pH ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 9.5

pH 3 คือ pH ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 11.0

ในส่วนของความหนืดพบว่า มีเพียง เวลา อุณหภูมิ pH และ อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยของความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ pH เท่านั้นที่มีผลต่อค่าความหนืดที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในตาราง ที่ 4.12 ในตารางที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่า ค่าเฉลี่ยของค่าความหนืดของเจลจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเพิ่มขึ้น และจะเริ่มมีค่าความหนืดที่คงที่เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที ในตารางที่ 4.14 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง ค่าเฉลี่ยของความหนืดจะมีค่าใกล้เคียงกันมากจึงจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ไม่มีผลต่อการเพิ่มของค่าเฉลี่ยของความหนืดอย่างมีนัยสำคัญ จากตารางที่ 4.15 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง ค่าเฉลี่ยของค่าความหนืดของเจลจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และจากตารางที่ 4.16 พบว่าค่าของ pH มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลแบ่งได้เป็น 2 ช่วง และไม่มีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความหนืดของเจลเนื่องจาก ความเข้มข้นของ เอนไซม์ เวลา อุณหภูมิ และ pH ในกระบวนการสกัด

Dependent Variable: ความหนืด

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	134.992(a)	323	.418	1.910	.000
Intercept	2919.499	1	2919.499	13339.053	.000
time	16.873	8	2.109	9.636	.000
enzyme	1.292	3	.431	1.967	.119
temp	36.002	2	18.001	82.246	.000
pH	1.483	2	.741	3.387	.035
time * enzyme	8.014	24	.334	1.526	.057
time * temp	4.017	16	.251	1.147	.310
enzyme * temp	2.054	6	.342	1.564	.157
time * enzyme * temp	12.182	48	.254	1.160	.229
time * pH	3.929	16	.246	1.122	.333
enzyme * pH	1.964	6	.327	1.496	.179
time * enzyme * pH	10.697	48	.223	1.018	.446
temp * pH	1.744	4	.436	1.992	.095
time * temp * pH	8.405	32	.263	1.200	.217
enzyme * temp * pH	4.781	12	.398	1.820	.044
time * enzyme * temp * pH	21.555	96	.225	1.026	.426
Error	70.913	324	.219		
Total	3125.404	648			
Corrected Total	205.906	647			

a R Squared = .656 (Adjusted R Squared = .312)

ตารางที่ 4.13 ค่าเฉลี่ยของค่าความหนืดของเจลที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเจลดิน

viscosity

Duncan

time	N	Subset*				
		1	2	3	4	5
1.00	72	1.8160				
2.00	72	1.9285	1.9285			
3.00	72		2.0032	2.0032		
5.00	72			2.1338	2.1338	
6.00	72				2.1689	2.1689
7.00	72				2.2282	2.2282
4.00	72				2.2340	2.2340
8.00	72				2.2579	2.2579
9.00	72					2.3329
Sig.		.150	.339	.095	.160	.061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .219.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 72.000.

b Alpha = .05.

* ซับเซต (Subset) ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่า ค่านั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยที่ time 1 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 20 นาที
time 2 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 40 นาที
time 3 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 60 นาที
time 4 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 80 นาที
time 5 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 100 นาที
time 6 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 120 นาที
time 7 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 140 นาที
time 8 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 160 นาที
time 9 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 180 นาที

ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยของค่าความหนืดของเจลที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดละติน

viscosity

Duncan

enzyme	N	Subset*
		1
3.00	162	2.0743
4.00	162	2.0822
2.00	162	2.1604
1.00	162	2.1735
Sig.		.082

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .219.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 162.000.

b Alpha = .05.

* ซับเซต (Subset) ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่า ค่านั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยที่ enzyme 1 คือ ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์

enzyme 2 คือ ชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 200 U/mg

enzyme 3 คือ ชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 5,000 U/mg

enzyme 4 คือ ชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 10,000 U/mg

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.15 ค่าเฉลี่ยของค่าความหนืดของเจลที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเจลาติน

viscosity

Duncan

temp	N	Subset*		
		1	2	3
1.00	216	1.8201		
2.00	216		2.1525	
3.00	216			2.3952
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .219.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 216.000.

b Alpha = .05.

* ซับเซต (Subset) ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่า ค่านั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยที่ temp 1 คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

temp 2 คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส

temp 3 คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.16 ค่าเฉลี่ยของค่าความหนืดของเจลที่ pH ต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเจลละติน

viscosity

Duncan

pH	N	Subset*	
		1	2
1.00	216	2.0601	
3.00	216	2.1314	2.1314
2.00	216		2.1763
Sig.		.114	.320

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .219.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 216.000.

b Alpha = .05.

* ซับเซต (Subset) ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่า ค่านั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยที่ pH 1 คือ pH ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 8.0

pH 2 คือ pH ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 9.5

pH 3 คือ pH ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 11.0

4.5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะที่ใช้ในการสกัด และสมบัติที่สำคัญของเจลละติน (ค่าความแข็งแรงของเจลและความหนืด)

จากการศึกษาผลของสภาวะที่ใช้ในการสกัดต่อค่าความแข็งแรง และความหนืดของเจลละตินที่ได้ โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลดีไซด์ พบว่าปัจจัยที่มีผลได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0-10,000 U/mg อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส และเวลา 20-180 นาที มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความแข็งแรงของเจลและความหนืดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงนำผลการทดลองในตารางที่ จ.13-จ.16 ในภาคผนวก จ มาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแข็งแรงของเจลของเจลละตินกับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัด ด้วยวิธี Multiple Regression (ผล

การวิเคราะห์แสดงในตารางที่ ก.2-ก.6 ภาคผนวก ก) ได้ความสัมพันธ์เพื่อนำมาใช้ในการทำนายค่าความแข็งแรงของเจล ดังสมการที่ 1

$$Y = 35.87X_1 + 6.54X_2 - 8.52X_3 - 35.46 \dots\dots\dots 1$$

$$R\text{-Squared} = 0.754$$

เมื่อ	Y	คือ	ค่าความแข็งแรงของเจล (Gel Strength)
	X_1	คือ	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) โดย $40^{\circ}\text{C} = 1$, $50^{\circ}\text{C} = 2$, $60^{\circ}\text{C} = 3$
	X_2	คือ	เวลา (min) โดย 20 นาที = 1,.....,..... และ 180 นาที = 9
	X_3	คือ	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/mg) โดย no enz. = 1, 200 U/mg = 2, 5000 U/mg = 3 และ 10,000 U/mg = 4

อย่างไรก็ตาม เมื่อทดลองสร้างสมการความสัมพันธ์ดังกล่าวแล้วจะเห็นได้ว่าหน่วยของตัวแปรอิสระทั้งสาม (X_1 , X_2 , X_3) มีหน่วยที่ต่างกัน จึงไม่สามารถนำค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่ยังไม่ได้ปรับค่าของตัวแปรอิสระแต่ละตัวไปเปรียบเทียบกันได้ว่าตัวแปรอิสระตัวใดมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม (Y) มากกว่าหรือน้อยกว่าตัวแปรอิสระตัวอื่น ดังนั้นจึงต้องทำการปรับน้ำหนักของค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยให้อยู่ในหน่วยเดียวกันก่อน (ซึ่งก็คือการเปลี่ยนค่าของตัวแปรอิสระให้เป็นคะแนนมาตรฐานก่อน) จึงจะนำไปวิเคราะห์ในสมการถดถอย เรียกค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่ปรับหน่วยการวัดแล้วนี้ว่า ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยมาตรฐาน ซึ่งสามารถนำค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่ปรับค่าแล้วนี้มาเปรียบเทียบกันได้ ดังแสดงในสมการที่ 2 ซึ่งจะบอกได้ว่าอุณหภูมิ (X_1) มีอิทธิพลต่อค่าความแข็งแรงของเจล (Y) มากกว่าเวลา (X_2) และความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_3) และยังสามารถบอกแนวโน้มของความสัมพันธ์ได้อีกว่าเป็นไปในเชิงบวกหรือลบโดยพิจารณาจากเครื่องหมายของค่าสัมประสิทธิ์ในสมการที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่ออุณหภูมิ และเวลาเพิ่มขึ้นค่าความแข็งแรงของเจลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นค่าความแข็งแรงของเจลมีแนวโน้มลดลง แต่สมการที่ 2 นี้จะไม่สามารถนำมาใช้ในการทำนายค่าความแข็งแรงของเจลได้

$$Y = 0.72X_1 + 0.42X_2 - 0.24X_3 \dots\dots\dots 2$$

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนืดของเจลของเจลละตินกับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัด (ผลการทดลองในตารางที่ จ.17-จ.20) ด้วยวิธี Multiple Regression

เช่นเดียวกัน(ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ ก.7-ก.11 ภาคผนวก ก) ได้ความสัมพันธ์เพื่อนำมาใช้ในการทำนายค่าความหนืดของเจล ดังสมการที่ 3

$$Y = 0.29X_1 + 5.74X_2 - 3.60X_3 + 1.35 \dots \dots \dots 3$$

$$R\text{-Squared} = 0.248$$

เมื่อ	Y	คือ	ค่าความหนืดของเจล (Viscosity)
	X ₁	คือ	อุณหภูมิ (°C) โดย 40°C = 1, 50°C = 2, 60°C = 3
	X ₂	คือ	เวลา (min) โดย 20 นาที = 1,.....,..... และ 180 นาที = 9
	X ₃	คือ	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/mg) โดย no enz. = 1, 200 U/mg = 2, 5000 U/mg = 3 และ 10,000 u/mg = 4

และเมื่อทำการปรับน้ำหนักของค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยให้อยู่ในหน่วยเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของตัวแปรอิสระทั้งสาม ที่มีผลต่อค่าความหนืดสามารถแสดงได้ในสมการที่ 4 ซึ่งจะบอกได้ว่าอุณหภูมิ (X₁) มีอิทธิพลต่อค่าความหนืดของเจล (Y)มากกว่าเวลา (X₂) และความเข้มข้นของเอนไซม์ (X₃) และแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับความหนืดที่ได้จากสมการที่ 3 นั้นจะเห็นได้ว่า เมื่ออุณหภูมิ และเวลาเพิ่มขึ้นค่าความหนืดของเจลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นค่าความหนืดของเจลมีแนวโน้มลดลง ซึ่งสมการที่ 4 นี้จะไม่สามารถนำมาใช้ในการทำนายค่าความหนืดได้เช่นเดียวกันกับสมการที่ 2 ของค่าความแข็งแรงของเจล

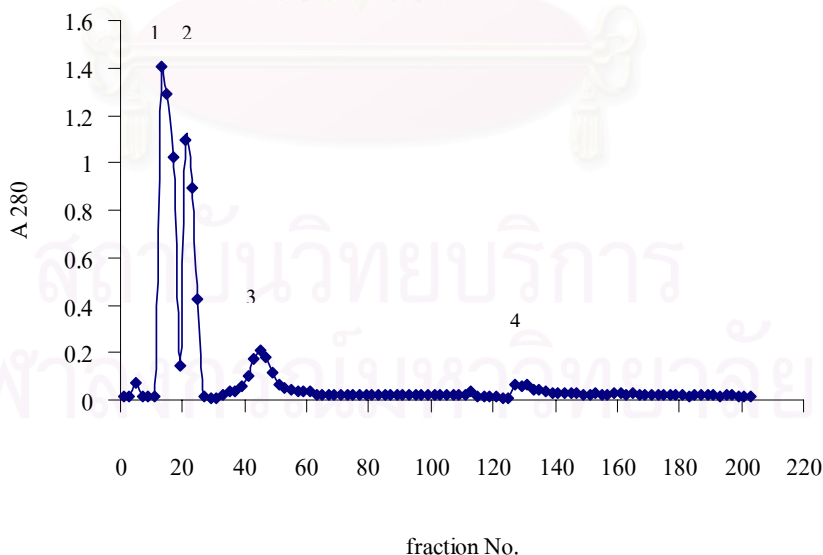
$$Y = 0.42X_1 + 0.26X_2 - 0.07X_3 \dots \dots \dots 4$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การศึกษาการทำบริสุทธิ์ของเอดะติน

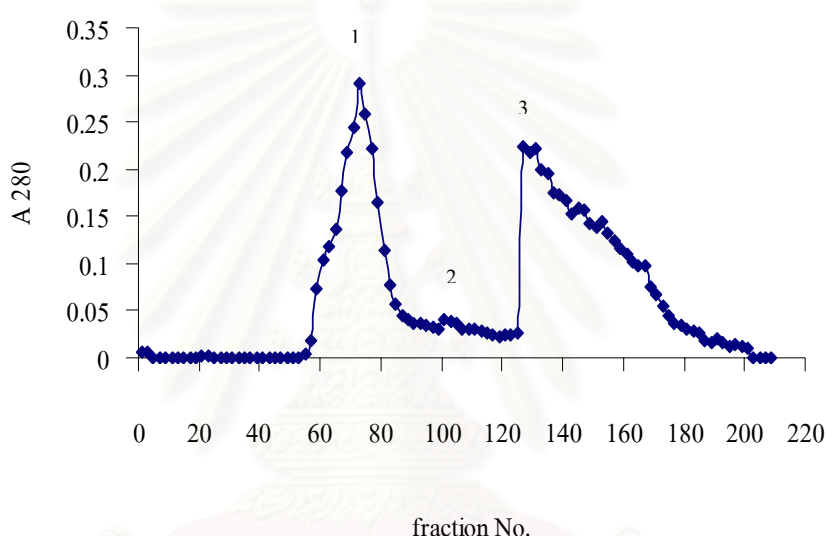
จากการทดลองทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยใช้เจลฟิเดรชัน Sephadex G-100 ซึ่งมี fractionation range อยู่ในช่วง 4,000-150,000 ดัลตัน และบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้คือชนิดเดียวกับที่ใช้ในขั้นตอนของการสกัด คือ 0.1 M Phosphste buffer pH 8.0, 9.5 และ 11.0 ในการทดลองใช้อัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร ต่อ นาที เก็บตัวอย่างหลอดละ 2 มิลลิลิตร (คอลัมน์ที่ใช้ในการทดลองกว้าง 2.4 เซนติเมตร สูง 88 เซนติเมตร มีปริมาตรของคอลัมน์เท่ากับ 398.25 มิลลิลิตร) แล้วทำการตรวจสอบตำแหน่งของโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำตัวอย่างเอดะตินที่ได้จากการสกัดที่สภาวะ pH 8.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 100 มิลลิกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่าสามารถแยกตัวอย่างเอดะตินออกมาได้อย่างน้อย 4 กลุ่ม ที่ Elution Volume (Ve) เท่ากับ 26, 42, 82 และ 254 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.35) เมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.2, 0.03, 3.02 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กราฟมาตรฐาน BSA ตาราง ง.4 ภาคผนวก ง) ตามลำดับ แต่จากกราฟรูปที่ 4.35 จะเห็นได้ว่าที่ Ve เท่ากับ 26 และ 42 มิลลิลิตรจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรสูงที่สุดแต่มีปริมาณโปรตีนน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนที่มีอยู่นั้นเป็นโปรตีนที่ม้วนแหวน (ring) แต่มีในปริมาณน้อย ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จึงมีค่ามากแต่ปริมาณโปรตีนที่ได้มีค่าน้อย ดังนั้นในขั้นตอนการตรวจสอบความบริสุทธิ์จึงได้เลือกค่า Ve ที่ 82 มิลลิลิตร มาทำการทดลองต่อเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนมากที่สุด



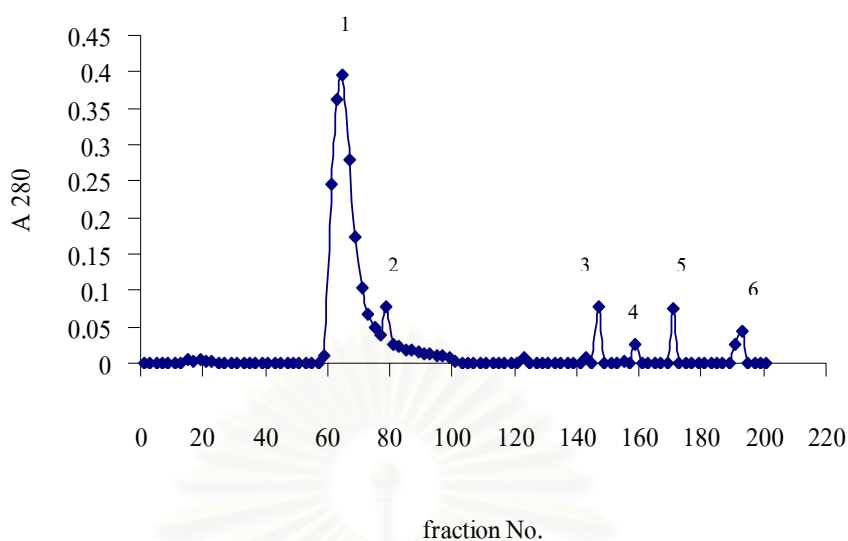
รูปที่ 4.35 โครมาโตแกรมจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ของเอดะตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 8.0

จากการทดลองนำตัวอย่างเจละดินที่ได้จากการสกัดที่สภาวะ pH 9.5 โดยไม่ใช้ เอนไซม์ในการสกัด (เป็นชุดทดลองควบคุม) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 100 มิลลิกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่าสามารถแยกตัวอย่างเจละดินออกมาได้อย่างน้อย 3 กลุ่ม ที่ Elution Volume (Ve) เท่ากับ 120, 200 และ 254 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.36) เมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนพบว่ามีค่าเท่ากับ 2.93, 0.49 และ 0.536 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร (กราฟมาตรฐาน BSA ตาราง ง.4 ภาคผนวก ง) ตามลำดับ โดยในขั้นตอนการตรวจสอบความบริสุทธิ์จึงได้เลือกค่า Ve ที่ 120 และ 254 มิลลิลิตร มาทำการทดลองต่อเนื่องจากมีปริมาณโปรตีน และ ปริมาตรมากเพียงพอที่จะใช้ในการทดลองต่อไป



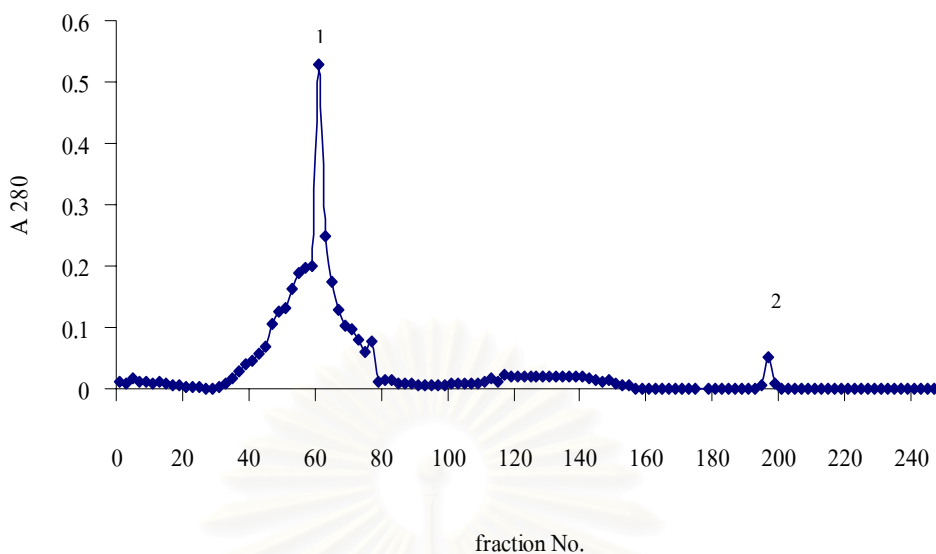
รูปที่ 4.36 โครมาโตแกรมจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ของเจละดินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 9.5

เมื่อนำตัวอย่างเจละดินที่ได้จากการสกัดที่สภาวะ pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 100 มิลลิกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่าสามารถแยกตัวอย่างเจละดินออกมาได้อย่างน้อย 6 กลุ่ม ที่ Elution Volume (Ve) เท่ากับ 120, 156, 292, 320, 342 และ 386 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.37) เมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนพบว่ามีค่าเท่ากับ 3.72, 1.50, 2.36, 1.10, 0.03 และ 0.396 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กราฟมาตรฐาน BSA ตาราง ง.4 ภาคผนวก ง) ตามลำดับ ซึ่งในขั้นตอนการตรวจสอบความบริสุทธิ์จึงได้เลือกค่า Ve ที่ 120 มิลลิลิตร มาทำการทดลองต่อเนื่องจากมีปริมาณโปรตีน และ ปริมาตรมากเพียงพอที่จะใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.37 โครมาโตแกรมจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ของเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 9.5

และเมื่อนำตัวอย่างเจละดินที่ได้จากการสกัดที่สภาวะ pH 11.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 100 มิลลิกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 เช่นเดียวกันพบว่าสามารถแยกตัวอย่างเจละดิน ออกมาได้อย่างน้อย 2 กลุ่ม ที่ Elution Volume (Ve) เท่ากับ 148 และ 338 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.38) เมื่อทำการวัดปริมาณ โปรตีนพบว่ามีค่าเท่ากับ 2.29 และ 1.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กราฟมาตรฐาน BSA ตาราง ง.4 ภาคผนวก ง) ตามลำดับ โดยในขั้นตอนการตรวจสอบความบริสุทธิ์จึงได้เลือกค่า Ve ที่ 148 มิลลิลิตร มาทำการทดลองต่อเนื่องจากมีปริมาณ โปรตีน และปริมาตรมากเพียงพอที่จะใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.38 โครมาโตแกรมจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 11.0

จากการศึกษาพบว่าที่สภาวะที่ใช้ในการสกัดต่างกันจะทำให้ได้ผลของโครมาโตแกรมในการทำบริสุทธิ์ที่ต่างกัน แต่รูปแบบที่ได้จะมีความคล้ายคลึงกัน โดยในการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์แต่ละตัวอย่างจะมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออกมาในช่วง V_e ประมาณ 80-140 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.35-4.38) และเมื่อนำเอาโปรตีนเหล่านั้นมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เทคนิค Freeze dry พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการทำ Freeze dry เมื่อนำมาละลายน้ำสามารถที่จะเกิดการรวมตัวกลับมาเป็นเจลได้ใหม่ในทุกตัวอย่างที่เลือกมาทำการทดลองต่อไปของแต่ละโครมาโตแกรมที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ดังกล่าวมาแล้ว และนอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์นี้จะมีสีและความใสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะได้้นำเอาโปรตีนเหล่านี้ไปทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ต่อไป

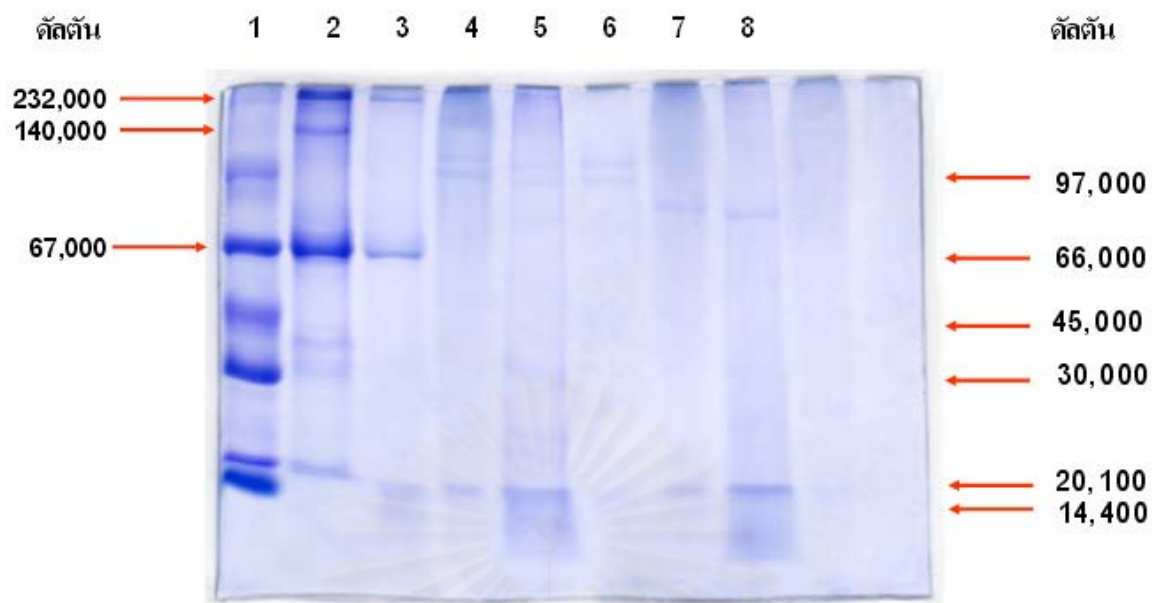
4.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

4.7.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีนเอนไซม์ โดยเทคนิคเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี Native-PAGE โดยใช้ 10 % polyacrylamide เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ผลที่ได้พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้ Shephadex-100 ที่มีสภาวะในการสกัด คือ pH 8.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

พบแถบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 104 และ 67 กิโลดัลตัน (แถวที่ 4 รูปที่ 4.39) เจลละตินที่มีสถานะในการสกัด คือ pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที พบแถบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 101 และ 93 กิโลดัลตัน (แถวที่ 5 รูปที่ 4.39) ที่สถานะที่ใช้ในการสกัด pH 9.5 อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที ไม่ใช่เอนไซม์ในการสกัด ที่มีค่า V_e เท่ากับ 120 มิลลิลิตร พบแถบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 104 และ 98 กิโลดัลตัน (แถวที่ 6 รูปที่ 4.39) และที่สถานะในการสกัดเดียวกัน ที่มีค่า V_e เท่ากับ 254 มิลลิลิตร พบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 83 กิโลดัลตัน(แถวที่ 7 รูปที่ 4.39) เจลละตินที่มีสถานะในการสกัด คือ pH 11.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที พบแถบโปรตีน 1 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 76 กิโลดัลตัน(แถวที่ 8 รูปที่ 4.39) และ ในส่วนของเจลละตินมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูงที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบพบแถบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 209 และ 67 กิโลดัลตัน (แถวที่ 3 รูปที่ 4.39)

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเจลละตินที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยใช้ Shephadex-100 นั้นสามารถทำให้มีความบริสุทธิ์ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น เพราะจะเห็นได้ว่าแถบของโปรตีนที่ได้จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส ด้วยวิธี Native-PAGE นั้นยังปรากฏแถบของโปรตีนมากกว่า 1 แถบ ซึ่งถ้าต้องการให้โปรตีนเจลละตินที่มีความบริสุทธิ์มากกว่านี้ควรทำการแยกโปรตีนที่ได้มากกว่า 1 ครั้ง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง(ในแถวที่ 3) พบว่ามีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.39 10%T Polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของเจลละตินจากการสกัดที่สถานะต่างๆ หลังจากผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100

แถวที่ 1 = โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (กราฟมาตรฐาน ง.11)

แถวที่ 2 = โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (กราฟมาตรฐาน ง.12)

แถวที่ 3 = โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

แถวที่ 4 = pH 8.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 5 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 6 = pH 9.5 ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที ($V_e = 120$)

แถวที่ 7 = pH 9.5 ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที ($V_e = 254$)

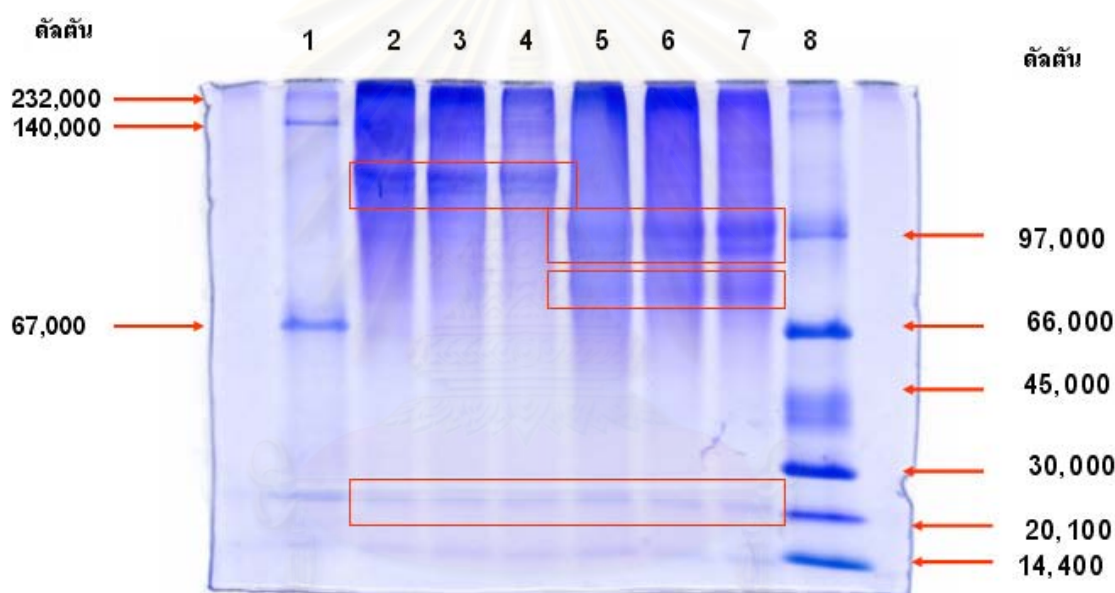
แถวที่ 8 = pH 11.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

4.7.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเจลละตินที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์

4.7.2.1 เปรียบเทียบผลของเวลา ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และ pH ที่ใช้ในการสกัด กับน้ำหนักโมเลกุลของเจลละติน

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเจลละติน โดยเทคนิคเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อนำเจลละตินที่ได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 10 % polyacrylamide เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน เมื่อดูในแถวที่ 2-4 รูปที่ 4.40 ผลที่ได้พบว่าเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เดียวกัน อุณหภูมิ และ pH เดียวกันแต่เวลาที่ใช้สกัดต่างกันจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่

เท่ากันแต่ความชัดเจนของแถบโปรตีนจะเข้มข้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับในแถวที่ 5-7 รูปที่ 4.40 และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างแถวที่ 2-4 กับ 5-7 โดยแถวที่ 2-4 ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด ซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุม แต่แถวที่ 5-7 ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในการสกัดเท่ากับ 5,000 U/mg พบว่ามีความแตกต่างของแถบโปรตีนโดยที่ชุดการทดลองควบคุมมีน้ำหนักโมเลกุลของเจละตินที่สูงกว่า และพบแถบของโปรตีน 3 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 202, 200 และ 18.56 กิโลดัลตัน ส่วนในเจละตินที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในการสกัดเท่ากับ 5,000 U/mg พบแถบของโปรตีน 4 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 96.96, 86.42, 66.72 และ 18.46 กิโลดัลตัน ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองนี้ไปหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของเจละตินกับสมบัติของเจละตินที่ได้คือ ค่าความแข็งแรงและความหนืดของเจละตินจะพบว่ามีความสัมพันธ์กันแบบแปรผันตาม คือเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของเจละตินเพิ่มขึ้นค่าความแข็งแรงและความหนืดของเจละตินจะมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย (รูปที่ 4.43)



รูปที่ 4.40 10%T Polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเจละตินจากการสกัดที่

สภาวะต่างๆ

แถวที่ 1 = โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (กราฟมาตรฐาน ง.5)

แถวที่ 2 = pH 9.5 ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด อุณหภูมิ 60 °C เวลา 20 นาที

แถวที่ 3 = pH 9.5 ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด อุณหภูมิ 60 °C เวลา 100 นาที

แถวที่ 4 = pH 9.5 ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

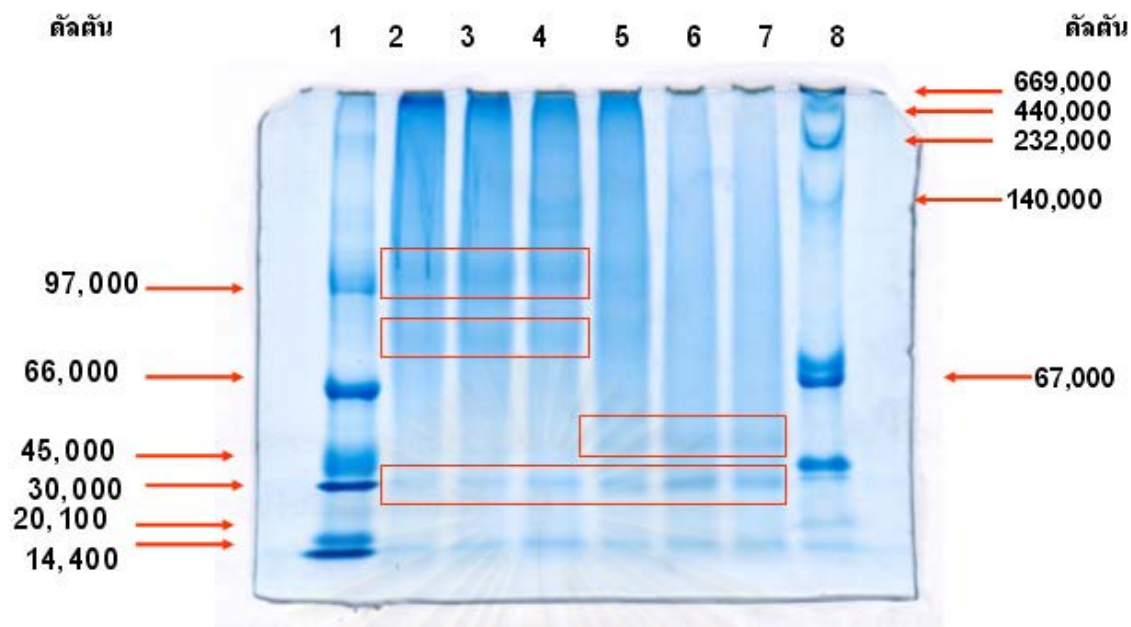
แถวที่ 5 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 20 นาที

แถวที่ 6 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 100 นาที

แถวที่ 7 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 8 = โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (กราฟมาตรฐาน ง.6)

จากรูปที่ 4.41 เมื่อดูในแถวที่ 2-4 ผลที่ได้พบว่าเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลา และ pH เดียวกันแต่อุณหภูมิที่ใช้สกัดต่างกัน พบว่าจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่เหมือนกันแต่ความชัดเจนของแถบโปรตีนจะเข้มข้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น(เช่นเดียวกับในแถวที่ 5-7 รูปที่ 4.41 ที่แถบของโปรตีนจะเข้มข้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดนานขึ้น) และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างแถวที่ 2-4 กับ 5-7 (รูปที่ 4.41) โดยแถวที่ 2-4 ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg ในการสกัด แต่แถวที่ 5-7ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในการสกัดเท่ากับ10,000 U/mg พบว่ามีความแตกต่างของแถบโปรตีนเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดต่างกัน โดยเจละดินที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg ในการสกัด มีน้ำหนักโมเลกุลของเจละดินที่สูงกว่า และพบแถบของโปรตีน 4 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 129.74, 110, 83.09 และ 29.70 กิโลดัลตัน ส่วนในเจละดินที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในการสกัดเท่ากับ 10,000 U/mg พบแถบของโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 36.27และ 28 กิโลดัลตัน ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองนี้ไปหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของเจละดินกับสมบัติของเจละดินที่ได้คือ ค่าความแข็งแรงและความหนืดของเจละจะพบว่ามีความสัมพันธ์กันแบบแปรผันตาม คือเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของเจละดินเพิ่มขึ้นค่าความแข็งแรงและความหนืดของเจละจะมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย (รูปที่ 4.43) และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับเจละดินที่ได้จากการสกัดด้วยกรด ต่าง และเอนไซม์ (Gudmundsson M., 2002) แล้วพบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน กล่าวคือ ค่าความแข็งแรงของเจละจะมีค่าสูง และเพิ่มมากขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของเจละดินเพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.41 10%T Polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของเจลละตินจากการสกัดที่สถานะต่างๆ

แถวที่ 1 = โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (กราฟมาตรฐาน ง.7)

แถวที่ 2 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 3 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg อุณหภูมิ 50 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 4 = pH 9.5 ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด 200 U/mg อุณหภูมิ 40 °C เวลา 180 นาที

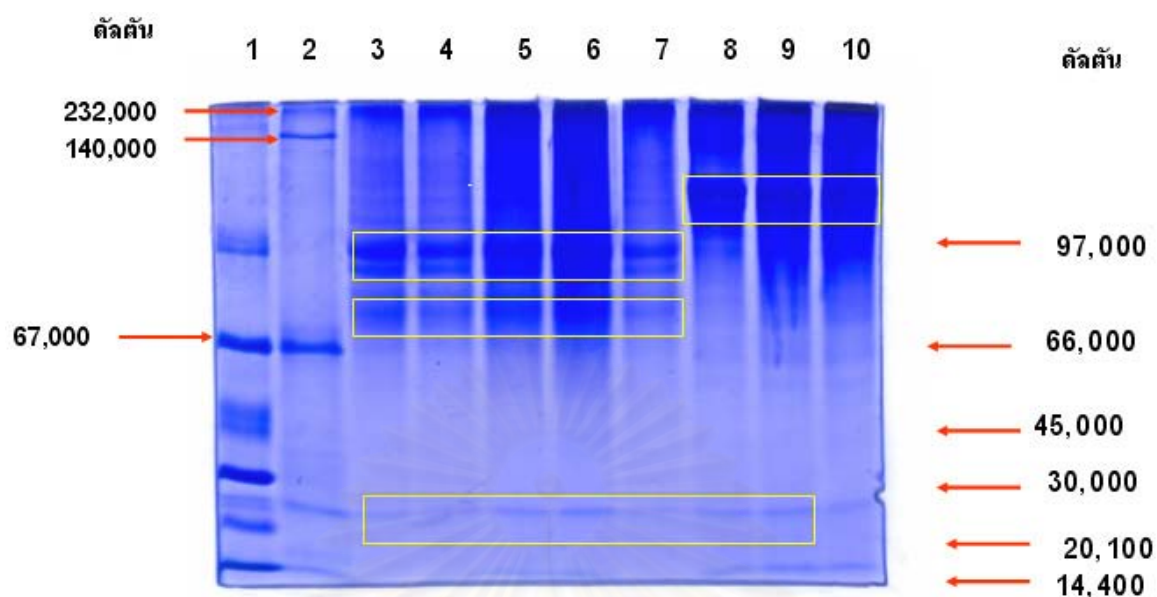
แถวที่ 5 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 6 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10,000 U/mg อุณหภูมิ 50 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 7 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10,000 U/mg อุณหภูมิ 40 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 8 = โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (กราฟมาตรฐาน ง.8)

จากรูปที่ 4.42 เมื่อดูในแถวที่ 3-7 ผลที่ได้พบว่าเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลา และ อุณหภูมิเดียวกันแต่ pH ที่ใช้สกัดต่างกันจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากัน เช่นเดียวกับในแถวที่ 8-10 รูปที่ 4.42 และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างแถวที่ 3-7 กับ 8-10 โดยแถวที่ 3-7 ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg ในการสกัด แต่แถวที่ 8-10 ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด พบว่ามีความแตกต่างของแถบโปรตีนโดยเจลละตินที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg ในการสกัด มีน้ำหนักโมเลกุลของเจลละตินที่น้อยกว่า และพบแถบของโปรตีน 4 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 96.96, 86.42, 66.72 และ 18.46 กิโลดัลตัน ส่วนในเจลละตินที่ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด พบแถบของโปรตีน 3 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 202, 200 และ 18.56 กิโลดัลตัน เช่นเดียวกับในรูปที่ 4.40



รูปที่ 4.42 10%T Polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของเจลาตินจากการสกัดที่
สภาวะต่างๆ

แถวที่ 1 = โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (กราฟมาตรฐาน ง.9)

แถวที่ 2 = โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (กราฟมาตรฐาน ง.10)

แถวที่ 3 = pH 8.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 4 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 5 = pH 11.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 6 = pH 11.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

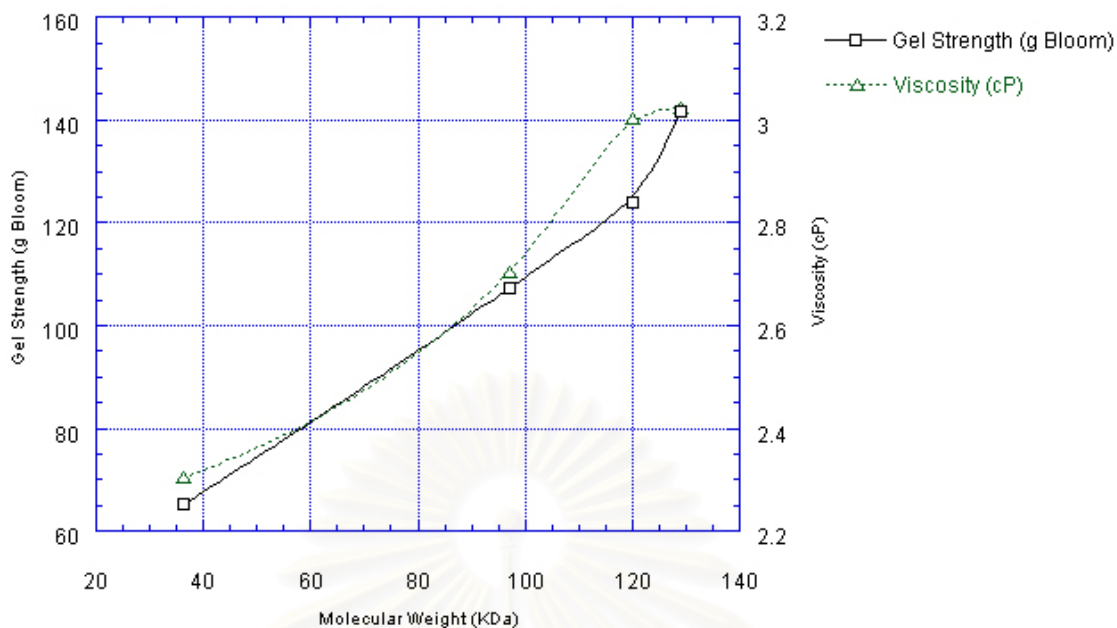
แถวที่ 7 = pH 8 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 8 = pH 8.0 ไม่ใช่เอนไซม์ในการสกัด อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 9 = pH 9.5 ไม่ใช่เอนไซม์ในการสกัด อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

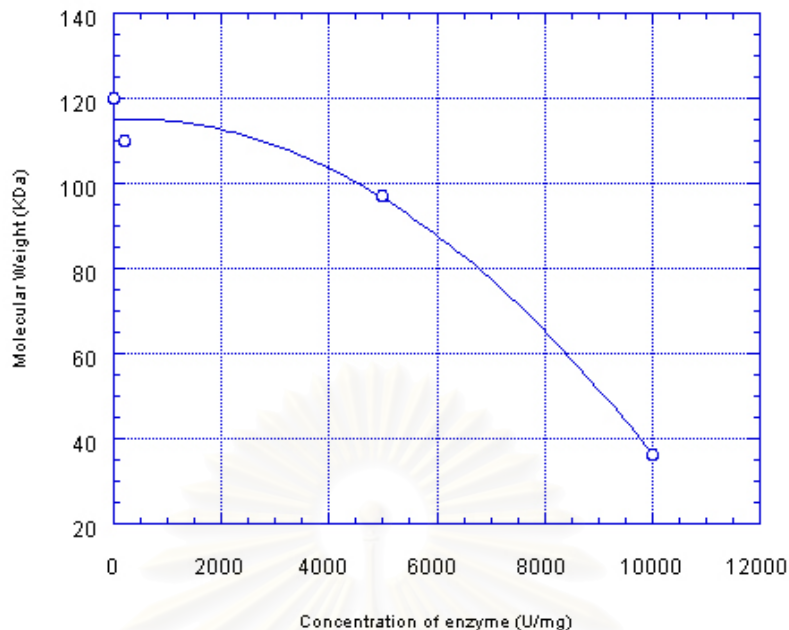
แถวที่ 10 = pH 11.0 ไม่ใช่เอนไซม์ในการสกัด อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.43 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินกับค่าความแข็งแรงของและความหนืดของเจลาตินที่ได้จากการทดลองสกัดด้วยเอนไซม์ Savinase 12T

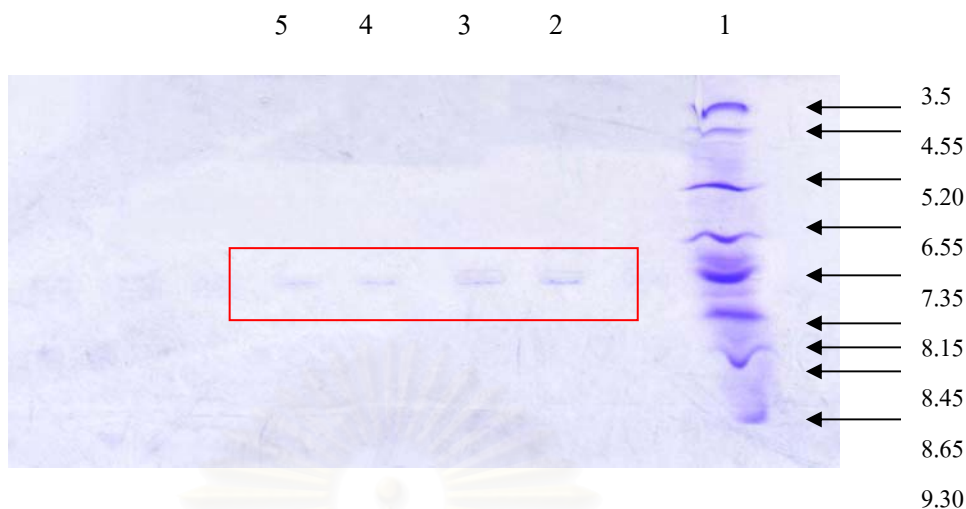
จากผลการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์ เมื่อนำค่าผลที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของเอนไซม์ กับน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินพบว่ามีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกัน คือเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น จาก 200 U/mg เป็น 5,000 และ 10,000 U/mg น้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินที่ได้จะมีค่าลดลง (รูปที่ 4.44) เช่นเดียวกับเจลาตินที่ได้จากการสกัดด้วย pepsin และ trypsin (Cabeza L.F et. al., 1997) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.001 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.01, 0.1, 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินที่ได้จะลดลงและมีปริมาณของเจลาตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการที่พันธะเพปไทด์ของเจลาตินถูกตัดหรือย่อยให้สั้นลงในกระบวนการสกัด (Linus G. Fonkwe, 1997) เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์ Savinase 12T ในการทดลองนี้กับน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินที่ได้จากการสกัดด้วยกรดหรือด่าง พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วงเช่นเดียวกัน คือ ช่วงน้ำหนักโมเลกุล 50-100 กิโลดัลตัน และ ช่วงน้ำหนักโมเลกุล 100-1,000 กิโลดัลตัน (Aristippos Gennadios, 2002) นอกจากนี้การสกัดเจลาตินด้วยเอนไซม์ในการทดลองยังทำให้ได้เจลาตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า 50 กิโลดัลตัน อีกด้วย



รูปที่ 4.44 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์กับน้ำหนักโมเลกุลของเจลละติน

4.8 ศึกษาถึงค่า pI

วัดโดยใช้ Isoelectric focusing polyacrylamidegel electrophoresis พบว่าเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg เวลา 180 นาที และ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ใช้ตัวอย่างเดียวกับข้อ 4.6) พบว่ามีค่าของ pI อยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน โดยเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที pH 8 จะมีค่า pI เท่ากับ 6.47 เจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที pH 9.5 มีค่า pI เท่ากับ 6.54 เจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที pH 9.5 มีค่า pI เท่ากับ 6.40 และเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที pH 11.0 มีค่า pI เท่ากับ 6.47 เมื่อพิจารณาถึงค่า pI ของเจลละตินที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์ Savinase 12T ที่กล่าวมาแล้วนั้นจะเห็นได้ว่าค่าของ pI ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วงที่แคบ คือ 6.40-6.54 เมื่อเทียบกับเจลละตินที่ได้จากการสกัดด้วยกรดและด่าง (ตารางที่ 4.17) และเป็นค่าที่อยู่ระหว่างกลางของค่า pI ของการสกัดด้วยกรดและด่าง ซึ่งเป็นข้อดีที่จะนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านต่างได้ค่อนข้างกว้าง



รูปที่ 4.45 Isofocusing polyacrylamide gel ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเจละตินที่ได้จากการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ

แถวที่ 1 = standard pI maker : (เส้นกราฟมาตรฐาน ง.13)

Amyloglucosidase	pI 3.50
Soybean trypsin inhibitor	pI 4.55
β -lactoglobulin	pI 5.20
Human carbonic anhydrase B	pI 6.55
Myoglobin-basic	pI 7.35
Lentil lectin acidic	pI 8.15
Lentil lectin middle	pI 8.45
Lentil lectin basic	pI 8.65
Trypsinogen	pI 9.30

แถวที่ 2 = pH 8.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 3 = pH 9.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 4 = pH 9.5 ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

แถวที่ 5 = pH 11.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg U/mg อุณหภูมิ 60 °C เวลา 180 นาที

ตารางที่ 4.17 เปรียบเทียบค่า pI และ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีการสกัด	pI
การสกัดด้วยกรด ได้ เอนไซม์ Type A	7-9*
การสกัดด้วยด่าง ได้ เอนไซม์ Type B	4.6-5.2*
การสกัดด้วย Savinase 12T	6.40-6.54

* ปลูกพล และ มันหนานา, 2544

4.9 ศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเอนไซม์

จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 N แล้วทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย HPLC (แสดงโครมาโตแกรมในภาคผนวก จ) ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4.17 พบว่าทั้งหนึ่งเป็ยกและเอนไซม์(ที่ได้จากการทดลองที่สภาวะที่ใช้ในการสกัด คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5,000 U/mg U/mg เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 9.5) มีปริมาณของกรดอะมิโนใกล้เคียงกัน และมีกรดอะมิโนหลักเหมือนกัน คือ ไกลซีนประมาณ 25.13 และ 26.25 โพรลีนประมาณ 13.78 และ 14.62 และกรดกลูตามิกประมาณ 10.55 และ 10.72 ตามลำดับ และเมื่อเทียบปริมาณกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์ในการทดลองนี้กับเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดด้วยกรดและด่างในอุตสาหกรรมพบว่าปริมาณของกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ปริมาณของกรดอะมิโนในเอนไซม์นี้จะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการสกัดเป็นสำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนของตัวอย่างหนังเปือก และ เจลละตินที่สกัดได้เทียบกับ เจลละตินในอุตสาหกรรม

AMINO ACIDS	ปริมาณ (ร้อยละ)			
	หนังเปือก*	เจลละตินที่สกัดได้*	เจลละตินในอุตสาหกรรม**	
			สกัดด้วยกรด	สกัดด้วยด่าง
Aspartic acid	6.13	6.02	6.2-6.7	6.6-6.9
Serine	4.04	3.93	2.9-4.1	3.2-4.2
Glutamic acid	10.56	10.73	11.3-11.7	11.1-11.4
Glycine	25.13	26.25	26.4-30.5	26.9-27.5
Histidine	1.49	1.35	0.8-1.0	0.7-0.8
Arginine	10.08	10.05	8.3-9.1	8.6-8.8
Threonine	2.37	2.34	2.2	2.2
Alanine	9.38	9.92	8.6-10.7	9.3-11.0
Proline	13.79	14.63	16.2-18.0	14-14.5
Tyrosine	1.21	0.69	0.4-0.9	0.2-1.0
Valine	2.99	2.56	2.5-2.8	2.6-3.4
Lysine	3.91	3.91	4.1-5.2	4.5-4.6
Isoleucine	2.09	1.81	1.4	1.7-1.8
Leucine	3.97	3.49	3.1-3.3	3.1-3.4
Phenylalanine	2.86	2.32	2.1-2.6	2.2-2.5

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 ครั้ง

** Aristippos Gennadios, 2002.

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ Savinase 12T. ในการย่อยเศษหนังเพื่อให้ได้เจลละติน

- สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยเศษหนังเพื่อให้ได้เจลละติน คือ สภาวะที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5

5.1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติที่สำคัญของเจลละตินคือค่าความแข็งแรงของเจลและค่าความหนืดของเจลกับภาวะที่ใช้ในการสกัด

- ค่าความแข็งแรงของเจล ขึ้นอยู่กับ เวลา ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้งสี่ที่ใช้ในการสกัด ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ได้ความสัมพันธ์เพื่อนำมาใช้ในการทำนายค่าความแข็งแรงของเจล ดังสมการ

$$Y = 35.87X_1 + 6.54X_2 - 8.52X_3 - 35.46$$

- ค่าความหนืดของเจล ขึ้นอยู่กับ เวลา อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยของ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ pH เท่านั้นที่มีผลต่อค่าความหนืดที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ได้ความสัมพันธ์เพื่อนำมาใช้ในการทำนายค่าความหนืดของเจล ดังสมการ

$$Y = 0.29X_1 + 5.74X_2 - 3.60X_3 + 1.35$$

5.1.3 การศึกษาการทำบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของเจลละติน

- เจลละตินที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 เพียงคอลัมน์เดียวมีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับเจลละตินมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง และเจลละตินที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ยังมีความสามารถในการเกิดเจล และมีสีและความใสดีขึ้นเมื่อเทียบกับเจลละตินที่ยังไม่ได้ผ่านคอลัมน์

- น้ำหนัก โมเลกุลของเจลละตินที่ได้จะมีความสัมพันธ์กับค่าความแข็งแรง และค่าความหนืดของเจล แบบแปรผันตาม

- ค่า pI ของเจลละตินที่ได้จากการสกัดมีค่าใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 6.40-6.54

- น้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินจะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ทดลองสกัดเจลาตินโดยเปลี่ยนเอนไซม์ที่ใช้ เพื่อทดลองหาเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยโปรตีนในหนังมากขึ้น และมีราคาที่ถูกที่สุด

5.2.2 นำเจลาตินที่สกัดได้มาผ่านการการทำบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้เจลาตินที่มีคุณภาพดีมากขึ้น และมีลักษณะเฉพาะที่จะนำมาใช้กับงานมากขึ้น

5.2.3 ทดลองแปรรูปเจลาตินที่ได้ด้วยกระบวนการอื่น เพื่อหาวิธีที่มีค่าใช้จ่ายคุ้มค่าที่สุด



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กัลยา วาณิชย์บัญชา. 2547. การใช้ SPSS for Windows ในการวิเคราะห์ข้อมูลฉบับปรับปรุงใหม่. ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เกริกชัย สุกาญจน์จิติ และ สุภาณี เขียวธนาคม. 2526. ลักษณะการอบแห้งและการเสื่อมสภาพเนื่องจากความร้อนของเงาติน. โครงการวิจัย เลขที่ 55-GER-2523. สถาบันวิจัยและพัฒนาของคณะวิศวกรรมศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- คู่มือการจัดการสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรมฟอกหนัง. 2540. สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม: 1-14.
- บุญรัตน์ กิติโสภานนท์, นงนุช สุขสุพลศิริ และ วนิดา กิตติบรรลุ. 2533. การสกัดเงาตินจากหนังหมู. โครงการงานวิทยาศาสตร์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปฐมพล อาษาคง และ มณฑนา บรรลือศักดิ์. 2544. การเตรียมพลาสติกหุ้มไส้กรอกจากเงาติน. ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ไพฑูรย์ ตันมศิริ. 2522. การวิเคราะห์แวนิลินและแผนการทดลองทางสถิติ. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัชณี ตันตะพานิชกุล. 2535. โครงสร้างและส่วนประกอบของเนื้อสัตว์. เอกสารประกอบการเรียนวิชาเคมีอาหาร. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2523. มาตรฐานผลิตภัณฑ์การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร: เล่ม 1. กระทรวงอุตสาหกรรม.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2531. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเงาติน. กระทรวงอุตสาหกรรม.
- สุพัตรา หนูนวน และ อพร ละออง. 2541. การสกัดเงาตินจากวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล. โครงการนักศึกษา. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุรพล อุปคิสสกุล. 2523. สถิติการวางแผนการทดลองเบื้องต้น. เอกสารประกอบการบรรยายและอบรมวิชาสถิติการวางแผนการทดลอง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิรดี อุดมสิน. 2546. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตนิวทรัลโปรตีนเอสเทนความร้อนจาก *Babillus cereus*. และลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรัญ หาญสืบสาย. 2546. การสื่อสารสื่ออย่างแม่นยำ: การควบคุมสีจากการรับรู้ไปสู่อุปกรณ์วัดสี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางภาพถ่ายและเทคโนโลยีทางการพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรัญ หาญสืบสาย. 2547. ภาษาแสง: จากการรับรู้สู่เครื่องมือวัด. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางภาพถ่ายและเทคโนโลยีทางการพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

A.O.A. C . 1995. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. The Association of Official Analytical Chemists, Inc. USA, Virginia.

Aristippos Gennadios. 2002. Formation and Properties of Collagen and Gelatin Films and Coatings. Protein-Based Films and Coatings. 275-304. CRC Press LLC.

Arnesen J. A. and Gildberg A. 2002. Preparation and characterisation of gelatin from the harp seal (*Phoca groenlandica*). Bioresource Technology. 82: 191-194.

Boonyarus S., Supachok S. and Sure P. 2000. Prification and characterization of highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. Protein Expression and Purification. 20: 142-151.

Brown E.M., Thompson C. J. and Taylor M.M. 1994. Molecular size and conformation of protein recovered from chrome shavings. Journal of the American Leather Chemits Association. 89: 215-220.

Cabeza L.F., Taylor M.M., Dimaio G.L. and et. al. 1997. Influence of pepsin and trypsin on chemical and physical propertiens of isolated gelatin from chrome shavings. Journal of the American Leather Chemits Association. 92: 200-207.

Cabeza L.F., Taylor M.M., Brown E.M. and Marmer W.N. 1998. Chemical and physical properties of protein products isolated from chromium-containing leather waste using two consecutive enzymes. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists. 82: 173-179.

Cabeza L.F., Taylor M.M., Dimaio G.L. and et. al. 1998. Processing of leather waste: pilot scale studies on chrome shavings. Part II. Purification of chrome cake and tanning trials. Journal of the American Leather Chemits Association. 93: 83-98.

- Cabeza L.F., Taylor M.M., Brown E.M. and Marmer W.N. 1999. Potential applications for gelatin isolated chromium-containing solid tannery waste: microencapsulation. Journal of the American Leather Chemists Association. 94: 182-189.
- Cantera C.S. Giuste M.D. and Sofia A. 1996. Hydrolysis of chrome shavings: application of collagen hydrolysate and 'Acrylic-Protein' in post tanning operations. Journal of the Leather and Chemists Association. 81: 183-191.
- Changdao M., Wei L., Mingrang Z. and Qingshi Z. 2003. Towards zero discharge of chromium-containing leather waste through improved alkali hydrolysis. Waste Management. 23: 835-843.
- Cho S.M., Gu Y.S. and Kim S.B. 2005. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids. 19: 221-229.
- Choi S.-S. and Regenstein J.M. 2000. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. Journal of Food Science. 65, 2: 194-199.
- Dalev P.G. and Simeonova L.S. 1992. An enzyme biotechnology for the total utilization of leather wastes. Biotechnology Letters. 14, 6 : 531-534.
- Edith van den Bosch and Constant Gielens. 2003. Gelatin degradation at elevated temperature. International Journal of Biological Macromolecules. 32: 129-138.
- Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. 1987. A Wiley-interscience publication. USA; 7.
- Francis A. Carey. 1992. Organic Chemistry. Second edition. McGRAW-HILL. USA.
- Gomer-Guillen M.C., Turnay J., Fernandez-Diaz M.D. and et al. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. Food Hydrocolloids. 16: 25-34.
- Grossman S. and Bergman M. 1992. Process for the production of gelatin from fish skin. United States Patent Number 5,093,474.
- Gudmundsson M. and Hafsteinsson H. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. Journal of Food Science. 62: 37-47.
- Gudmundsson M. 2002. Rheological properties of fish gelatins. Journal of Food Science. 67, 6: 2172-2176.
- Hill S.E., Ledward D.A. and Mitchell J.R. 1998. Gelation of globular protein. Functional Properties of Food Macromolecules. Second edition. 77-142.

- International Trade Centre Unctad/GATT. 1984. GELATIN: an overview of the world market with special reference to the potential for developing countries. GENEVA.
- Israelachvili J.N. 1985. Intermolecular and Surface Forces: with Application to Colloidal and Biological System. London: Academic Press.
- Jamilah B. and Harvinder K.G. 2002. Properties of gelatins from skins of fish – black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). Food Chemistry. 77: 81-84.
- Kida K, Morimura S, Noda I, Nishida Y, Imai T and Otagiri M. 1995. Enzymatic hydrolysis of the horn and hoof of cow and buffalo. Journal of Fermentation and Bioengineering. 80: 478-484.
- Kim SK, Byun HG, Park PJ and Shahidi F. 2001. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from bovine skin gelatin hydrolysate. Journal of Agricultural & Food Chemistry. 49: 2992- 2997.
- Kirk-Othmer. 1966. Encyclopedia of Chemical Technology. Second Edition. New York: The interscience Encyclopedia Inc.
- Kirk-Othmer. 1978. Encyclopedia of Chemical Technology. Third Edition. New York: The interscience Encyclopedia Inc.
- Langmaier F., Kolomaznik K., Sukop S. and Mladek M. 1999. Products of enzymatic decomposition of chrome-tanned leather waste. Journal of Society of Leather Technologists and Chemists. 83 :187-195.
- Linus G. Fonkwe and Rakesh K. Singh. 1997. Production and characterization of gelatinous protein extracts from turkey deboner residue. Process Biochemistry. 32, 4. 309-318.
- Linus Pauling, Robert B. Corey, and H. R. Branson. 1951. The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 37, 4: 205-11.
- Liu H.J., Chang B.Y., Yan H.W., Yu F. H. and Liu X. X. 1995. Analyzing Feed Hydrolysate Samples Using the AccQ•Tag™ Method. Journal of AOAC INTERNATIONAL. 78, 3.
- Loeven W.A. 1954. Ewffect of Alkali Treatment of Collagen on the pH Swelling Curve of Collagen and of Gelatin Products Prepared from It. Journal of the Society of Leather Trades Chemists. 38: 117-125.

- Morimura S, Nagata H, Uemura Y, Fahmi A, Shigematsu T and Kida K. 2002. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. Process Biochemistry. 37: 1403 -1412.
- Mrak E.M. and Stewart G. F. 1957. Advances in Food Research. 7: 235-328.
- Petersen B. R. et al. 1977. Gelatin extraction. United States Patent Number 4,064,008.
- Rainville et al. 2000. Gelatin and method of manufacture. United States Patent Number 6,080,843.
- Raja N. Z. Abd. R., Che N. R., Kamaruzaman A. and et. al. 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. Applied Microbiology and Biotechnology. 822-827.
- Regina Komsa-Penkova, Rositza S. and Blagovest B. 1996. Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 32: 33-43.
- Robinson J.W. 1995. Undergraduate Instrumental Analysis. Fifth Edition. Revised and Expanded. 642-647, 653-658.
- Shreve R. N. Leather, Gelatin, and Adhesives. 1967. Chemical Process Industries. Third Edition. McGraw-Hill Kogakusha: 456-472.
- Simeonova L.S. and Dalev P.G. 1996. Utilization of a leather industry waste. Waste Management. 16, 8: 765-769.
- Surachai Y. 2003. Purification and characterization of isoforms of starch branching enzyme from tuber of cassava *Manihot esculenta* crantz. Master's Thesis, Department of Biochemistry, Faculty of Science. Chulalongkorn university.
- Taylor M.M., Diefendorf EJ, Foglia TA, et al.1989. Enzymatic treatment of offal from fleshing machines. Journal of the American Leather Chemists Association. 84: 71-78.
- Taylor M.M., Diefendorf E.J., Na G.C.1990. Enzymatic treatment of chrome shavings. Journal of the American Leather Chemists Association. 85: 264-275.
- Taylor M.M., Diefendorf E.J, Marmer W.N., et al. 1990. Enzymatic processing of materials containing chromium and protein. U.S. Patent Number 5,094,946.
- Taylor M.M., Diefendorf E.J., Brown E.M. and Marmer W.N. 1992. Characterization of products isolated by enzyme treatment of chromium-containing leather waste. Journal of the American Leather Chemists Association. 87: 380-389.

- Taylor M.M., Diefendorf EJ, Marmer W.N. and Brown E.M. 1994. Effect of various alkalinity inducing agents on chemical and physical properties of protein products isolated from chromium-containing leather waste. Journal of the American Leather Chemists Association. 89: 221-228.
- Taylor M.M., Cabeza L.F., Marmer W.N. and Brown E.M. 2001. Enzymatic modification of hydrolysis products from collagen using a microbial transglutaminase. I. Physical properties. Journal of the American Leather Chemists Association. 96: 319-332.
- Yang V.W., Zhuang Z., Elegir G and Jeffries T.W. 1995. Alkaline-active xylanase produced by alkaliphilic *Bacillus sp* isolated from kraft pulp. Journal of Industrial Microbiology. 15: 434-441.
- Zeljko Bajza and Valerije Vrcek. 2001. Thermal and enzymatic recovering of proteins from untanned leather waste. Waste Management. 21: 79-84.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. องค์ประกอบของเจลดินที่มีความบริสุทธิ์สูงที่ใช้เป็นเจลดินมาตรฐานในการทดลอง

เจลดินที่มีความบริสุทธิ์สูงที่ใช้เป็นเจลดินมาตรฐานในการทดลอง มีสมบัติที่ได้จากการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ ก.1 องค์ประกอบเจลดินที่มีความบริสุทธิ์สูง

องค์ประกอบ	ปริมาณ โดยเฉลี่ย
pH	5.0
โปรตีน	86.16 %
ไขมัน	1.54 %
ความชื้น	10.41 %
เถ้า	0.22 %
ค่าความแข็งแรงของเจล	250 g Bloom
ความหนืด	3.87 cps
สี (E)	91.16

2. การคำนวณน้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีนของเจลดินที่ได้จากการสกัด

2.1 Dry Weight Recovery (%)

จากการวิเคราะห์ความชื้นในหนังเปียก พบว่าหนังเปียกมีความชื้น 62.83 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงมีปริมาณของแข็ง (หนังแห้ง) 37.17 เปอร์เซ็นต์

หนังเปียก	100	กรัม	มีน้ำหนักแห้ง	37.17	กรัม
ใช้หนังเปียกในการทดลอง	500	กรัม	คิดเป็นน้ำหนักแห้ง	185.85	กรัม

ในการทดลองใช้หนังแห้ง 185.85 กรัม เดิมบัฟเฟอร์ 2000 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างครั้งละ 200 มิลลิลิตร

ตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร มีน้ำหนักแห้ง 185.85 กรัม

ถ้าตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร มีน้ำหนักแห้ง 18.58 กรัม

ตัวอย่างการคำนวณ Dry Weight Recovery (%)

เจลาตินที่ได้จากการการสกัด ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที pH 9.5 ได้เจลาตินหนัก 15.8132 กรัม

หนังแห้งหนัก	18.58	กรัม	คิดเป็น	100	เปอร์เซ็นต์
ถ้าเจลาตินหนัก	15.8132	กรัม	คิดเป็น	<u>85.10</u>	เปอร์เซ็นต์

2.2 Protein Recovery (%)

จากการวิเคราะห์โปรตีนในหนังแห้ง พบว่าหนังแห้ง 1 กรัม มีปริมาณโปรตีน 0.8241 กรัม คิดเป็น 82.41 เปอร์เซ็นต์

หนังแห้ง	1	กรัม	มีโปรตีน	0.8241	กรัม
ใช้หนังแห้งในการทดลอง	185.85	กรัม	มีโปรตีน	153.16	กรัม

ในการทดลองใช้หนังแห้ง 185.85 กรัม เดิมบัฟเฟอร์ 2000 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างครั้งละ 200 มิลลิลิตร

ตัวอย่างปริมาตร	2000	มิลลิลิตร	มีโปรตีน	153.16	กรัม
ถ้าตัวอย่างปริมาตร	200	มิลลิลิตร	มีโปรตีน	15.30	กรัม

ตัวอย่างการคำนวณ Protein Recovery (%)

เจลาตินที่ได้จากการการสกัด ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 200 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที pH 9.5 ได้เจลาตินหนัก 15.8132 กรัม มีโปรตีน 12.33 กรัมต่อกรัมเจลาตินผง

โปรตีนเริ่มต้น	15.30	กรัม	คิดเป็น	100	เปอร์เซ็นต์
ถ้าโปรตีน	12.33	กรัม	คิดเป็น	<u>80.59</u>	เปอร์เซ็นต์

3. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะที่ใช้ในการสกัด และสมบัติที่สำคัญของเจลาติน

3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความแข็งแรงของเจล(Gel strength)

ตารางที่ ก.2 ผลลัพธ์แสดงค่าสถิติพรรณนาของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความแข็งแรงของเจล

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
GEL	47.6426	40.4744	648
TIME	5.0000	2.5840	648
ENZYME	2.5000	1.1189	648
TEMP	2.0000	.8171	648
PH	2.0000	.8171	648

จากตารางที่ ก.2 จะเห็นได้ว่าค่าความแข็งแรงของเจลที่ได้จากการทดลอง จำนวน 648 ตัวอย่าง มีค่าความแข็งแรงของเจลโดยเฉลี่ยเท่ากับ 47.64 g Bloom ที่สภาวะที่ใช้ในการสกัด คือ เวลา 100 นาที ความเข้มข้นของเอนไซม์ระหว่าง 200-5,000 U/mg อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 9.5

ตารางที่ ก.3 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ และ ค่า F และ ค่า Sig ที่เปลี่ยนไปของสภาวะที่ใช้ในการสกัด กับค่าความแข็งแรงของเจล

Model Summary^d

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics					Durbin-Watson
					R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change	
1	.724 ^a	.524	.524	27.9345	.524	712.261	1	646	.000	
2	.836 ^b	.698	.697	22.2610	.174	372.247	1	645	.000	
3	.868 ^c	.754	.753	20.1231	.056	145.329	1	644	.000	.566

a. Predictors: (Constant), TEMP

b. Predictors: (Constant), TEMP, TIME

c. Predictors: (Constant), TEMP, TIME, ENZYME

d. Dependent Variable: GEL

จากตารางที่ ก.3 จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิ (TEMP) เวลา (TIME) และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ (ENZYME) มีความสัมพันธ์กับค่าความแข็งแรงของเจลสูงมาก ($R = .868$) และสามารถอธิบายความผันแปรของค่าความแข็งแรงของเจลได้ถึงร้อยละ 75.4 ($R^2 = .754$)

ตารางที่ ก.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความแข็งแรงของเจล

ANOVA^d

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	555804.2	1	555804.216	712.261	.000 ^a
	Residual	504097.9	646	780.337		
	Total	1059902	647			
2	Regression	740271.6	2	370135.791	746.917	.000 ^b
	Residual	319630.5	645	495.551		
	Total	1059902	647			
3	Regression	799120.9	3	266373.646	657.811	.000 ^c
	Residual	260781.2	644	404.940		
	Total	1059902	647			

a. Predictors: (Constant), TEMP

b. Predictors: (Constant), TEMP, TIME

c. Predictors: (Constant), TEMP, TIME, ENZYME

d. Dependent Variable: GEL

จากตารางที่ ก.4 ผลของการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าจากการทดสอบตัวแปรอิสระทั้งสามมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามในรูปเชิงเส้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ค่า Sig ของทั้ง 3 โมเดลเท่ากับ .000) แสดงว่า สมการถดถอยที่สร้างขึ้นสามารถนำไปใช้ได้จริง

ตารางที่ ก.5 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย และการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระแต่ละตัวกับตัวแปรตามของสถานะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความแข็งแรงของเจล

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	Collinearity Statistics	
		B	Std. Error	Beta			Tolerance	VIF
1	(Constant)	-24.095	2.903		-8.299	.000		
	TEMP	35.869	1.344	.724	26.688	.000	1.000	1.000
2	(Constant)	-56.768	2.867		-19.799	.000		
	TEMP	35.869	1.071	.724	33.490	.000	1.000	1.000
	TIME	6.535	.339	.417	19.294	.000	1.000	1.000
3	(Constant)	-35.459	3.137		-11.303	.000		
	TEMP	35.869	.968	.724	37.048	.000	1.000	1.000
	TIME	6.535	.306	.417	21.343	.000	1.000	1.000
	ENZyme	-8.524	.707	-.236	-12.055	.000	1.000	1.000

a. Dependent Variable: GEL

จากตารางที่ ก.5 สามารถนำค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่ได้จากโมเดล 3 มาสร้างสมการถดถอยเพื่อทำนายค่าตัวแปรตาม (ค่าความแข็งแรงของเจล) โดยใช้ค่า B ในการสมการถดถอยที่ยังไม่ได้ปรับค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย และใช้ค่า Beta ในการสมการถดถอยที่ปรับค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยแล้ว และบอกความสัมพันธ์ว่าได้ว่าตัวแปรอิสระ คือ อุณหภูมิ (TEMP) และเวลา (TIME) มีความกับตัวแปรตาม (ค่าความแข็งแรงของเจล) ในเชิงบวก ส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ (ENZyme) มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามในเชิงลบ โดยพิจารณาจากเครื่องหมายของค่าสัมประสิทธิ์ของค่า B และสามารถบอกได้ว่าอุณหภูมิ มีอิทธิพลต่อค่าความแข็งแรงของเจลมากที่สุด รองลงมาคือ เวลา และความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยที่ปรับมาตรฐานแล้วของค่า Beta ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ค่า Sig ของทั้ง 3 โมเดลเท่ากับ .000)

ตารางที่ ก.6 ผลลัพธ์ของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlations) ระหว่างตัวแปรต่างๆของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความแข็งแรงของเจล

Correlations

		GEL	TIME	ENZYME	TEMP	PH
Pearson Correlation	GEL	1.000	.417	-.236	.724	-.024
	TIME	.417	1.000	.000	.000	.000
	ENZYME	-.236	.000	1.000	.000	.000
	TEMP	.724	.000	.000	1.000	.000
	PH	-.024	.000	.000	.000	1.000
Sig. (1-tailed)	GEL	.	.000	.000	.000	.272
	TIME	.000	.	.500	.500	.500
	ENZYME	.000	.500	.	.500	.500
	TEMP	.000	.500	.500	.	.500
	PH	.272	.500	.500	.500	.
N	GEL	648	648	648	648	648
	TIME	648	648	648	648	648
	ENZYME	648	648	648	648	648
	TEMP	648	648	648	648	648
	PH	648	648	648	648	648

จากตารางที่ ก.6 แสดงให้เห็นว่า มีตัวแปรอิสระเพียง 3 ค่า เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม คือ อุณหภูมิ (TEMP) เวลา (TIME) และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ (ENZYME) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยตัวแปรอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม (ค่าความแข็งแรงของเจล) มากที่สุด โดยดูได้จากค่า r (Pearson Correlation) ซึ่งมีค่าสูงกว่าตัวแปรอื่น ($r = .724$) รองลงมาคือ เวลา ($r = .417$) ส่วนตัวแปรความเข้มข้นของเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามเพียง .236 และจะสังเกตเห็นว่า ระดับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระด้วยกันมีค่าต่ำ ซึ่งเป็นสิ่งที่ดีเพราะในการวิเคราะห์การถดถอยนั้นตัวแปรอิสระต่าง ๆ ต้องไม่มีความสัมพันธ์กัน

3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความหนืด (Viscosity)

ในการอ่านผลการวิเคราะห์จากตารางสามารถทำได้เช่นเดียวกับผลของการวิเคราะห์ค่าความแข็งแรงของเจลดังแสดงข้างต้น

ตารางที่ ก.7 ผลลัพธ์แสดงค่าสถิติพรรณนาของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความหนืด

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
VISCOSIT	2.1226	.5641	648
TIME	5.0000	2.5840	648
ENZYME	2.5000	1.1189	648
TEMP	2.0000	.8171	648
PH	2.0000	.8171	648

ตารางที่ ก.8 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ และ ค่า F และ ค่า Sig ที่เปลี่ยนไปของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความหนืด

Model Summary^d

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics					Durbin-Watson
					R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change	
1	.416 ^a	.173	.172	.5133	.173	135.557	1	646	.000	
2	.492 ^b	.242	.240	.4918	.069	58.752	1	645	.000	
3	.498 ^c	.248	.244	.4905	.005	4.357	1	644	.037	1.904

a. Predictors: (Constant), TEMP

b. Predictors: (Constant), TEMP, TIME

c. Predictors: (Constant), TEMP, TIME, ENZYME

d. Dependent Variable: VISCOSIT

ตารางที่ ก.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความหนืด

ANOVA^d

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	35.713	1	35.713	135.557	.000 ^a
	Residual	170.192	646	.263		
	Total	205.906	647			
2	Regression	49.922	2	24.961	103.214	.000 ^b
	Residual	155.984	645	.242		
	Total	205.906	647			
3	Regression	50.970	3	16.990	70.620	.000 ^c
	Residual	154.936	644	.241		
	Total	205.906	647			

a. Predictors: (Constant), TEMP

b. Predictors: (Constant), TEMP, TIME

c. Predictors: (Constant), TEMP, TIME, ENZYME

d. Dependent Variable: VISCOSIT

ตารางที่ ก.10 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย และการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระแต่ละตัว กับตัวแปรตามของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความหนืด

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	Collinearity Statistics	
		B	Std. Error	Beta			Tolerance	VIF
1	(Constant)	1.548	.053		29.009	.000		
	TEMP	.288	.025	.416	11.643	.000	1.000	1.000
2	(Constant)	1.261	.063		19.905	.000		
	TEMP	.288	.024	.416	12.152	.000	1.000	1.000
	TIME	5.735E-02	.007	.263	7.665	.000	1.000	1.000
3	(Constant)	1.351	.076		17.664	.000		
	TEMP	.288	.024	.416	12.184	.000	1.000	1.000
	TIME	5.735E-02	.007	.263	7.685	.000	1.000	1.000
	ENZYME	-3.60E-02	.017	-.071	-2.087	.037	1.000	1.000

a. Dependent Variable: VISCOSIT

ตารางที่ ก.11 ผลลัพธ์ของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlations) ระหว่างตัวแปรต่างๆ ของสภาวะที่ใช้ในการสกัดกับค่าความหนืด

Coefficients

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	Collinearity Statistics	
		B	Std. Error	Beta			Tolerance	VIF
1	(Constant)	1.548	.053		29.009	.000		
	TEMP	.288	.025	.416	11.643	.000	1.000	1.000
2	(Constant)	1.261	.063		19.905	.000		
	TEMP	.288	.024	.416	12.152	.000	1.000	1.000
	TIME	.735E-02	.007	.263	7.665	.000	1.000	1.000
3	(Constant)	1.351	.076		17.664	.000		
	TEMP	.288	.024	.416	12.184	.000	1.000	1.000
	TIME	.735E-02	.007	.263	7.685	.000	1.000	1.000
	ENZYME	3.60E-02	.017	-.071	-2.087	.037	1.000	1.000

a. Dependent Variable: VISCOSIT

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

1. การเตรียม Azo-casein

1.1 เตรียม 0.2% azo-casein

ชั่ง azo-casein 1 กรัม เติม absolute ethanol มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
คนจนสารละลายหมด แล้วจึงเติม toluene 1 มิลลิลิตร

วิธีคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลด์โปรตีเอส

1 หน่วย แอกติวิตี = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 เปลี่ยนไป 0.1 หน่วย

- ใช้เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร คิดเป็น แอกติวิตี 1 หน่วย

ถ้าใช้เอนไซม์ 1000 ไมโครลิตร คิดเป็น แอกติวิตี $1 \times 1000 / 100 = 10$ หน่วย

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 เปลี่ยนไป 0.1 หน่วย คิดเป็น แอกติวิตี 1 หน่วย

- ถ้าค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 เปลี่ยนไป 1 หน่วย คิดเป็น แอกติวิตี $1 \times 1 / .01 = 10$ หน่วย

ดังนั้น Activity of alkaline protease = $(A_{440_{\text{sample}}} - A_{440_{\text{control}}}) \times 100$

2. การเตรียมสารสำหรับอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

2.1 โพลีอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอะคริลาไมด์ 30 กรัม และ เมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำ
กลั่น 100 มิลลิลิตร คนสารในที่มืด กรองและเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 Separating gel ชนิดที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ Stacking
gel ชนิดที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ได้จากการผสมสารดังนี้

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารที่ใช้ในการทำโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดีเนเจอร์

Reagent	Stacking gel 3 %	Separating gel 10%
30% Acrylamide+0.8% Bis Acryl (ml)	3.9 ml	3.75 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (ml)	-	2.813 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	0.75 ml	-
1% SDS (ml)	20 μ l	1.125 ml
Distilled water (ml)	1.85 ml	3.25 ml
10% Ammonium persulfate (ml) TEMED	30 μ l	282 μ l
(ml)	5 μ l	6 μ l
Total	30.25 ml	11.225 ml

2.3 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับตัวอย่าง (Sample buffer)

ซังโบรโมฟีนอลบลู 0.005 กรัม นำมาละลายใน ทริส-ไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติมไกลซีซีน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เอสดีเอส เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2.4 อิเล็กโตรโฟรีซิส บัฟเฟอร์ (Electrophoresis buffer)

ซังทริส(ไฮดรอกซี)-แอมมีโนมีเทน 3.03 กรัม ไกลซีน 14.40 กรัม และ เอสดีเอส 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร โดยไม่ต้องปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายประมาณ 8.3)

3. การเตรียมสารสำหรับไอโซอิเล็กทริก โฟกัสซิ่ง อิเล็กโตรโฟเรซิส

3.1 การเตรียม 24.25% อะคริลาไมด์ ; 0.75% บิส-อะคริลาไมด์

ซึ่งอะคริลาไมด์ 24.25 กรัม และ เมทิลรีนบิสอะคริลาไมด์ 0.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนสารในที่มืด กรองและเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียม 0.1% ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)

ซึ่ง ไรโบฟลาวิน 50 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร นำไปต้มจนละลายปรับปริมาตรจนได้ 50 มิลลิลิตร

ตารางที่ ข.2 การเตรียมสารที่ใช้ในการทำไอโซอิเล็กทริก โฟกัสซิ่ง อิเล็กโตรโฟเรซิส

Reagent	Volume (ml)
25 % Polyacrylamide	1
H ₂ O	2.75
25 % glycerol	1
Ampholyte	0.25
10 % Ammonium persulfate	0.015
0.1 % Riboflavin	0.050
TEMED	0.005

3.3 การเตรียมสารละลายฟิกเซทีฟ (Fixative solution)

ซึ่ง Sulfosalicylic acid 4 กรัม และ Trichloroacetic acid 12.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติมนีแทนอลปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงไป ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 100 มิลลิลิตร

3.4 สีย้อมโปรตีน (staining solution)

ซังโคแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250 จำนวน 5 กรัม ละลายใน เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450 มิลลิลิตร กรดกลูเซียมอะซิติก 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.5 สารละลายล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution)

ผสมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร กรดกลูเซียมอะซิติก 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์สมบัติของเจลละติน

1. วิธีหาปริมาณความชื้น (Moisture content) A.O.A.C. 1980 - 14.004

1.1 นำถ้วยอะลูมิเนียมไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.2 ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของถ้วยอะลูมิเนียมจากนั้นใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 1 กรัม ให้ละเอียดถึงเทคนิคตำแหน่งที่ 4 (คือมีความผิดพลาดน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัม) ในถ้วยอะลูมิเนียมบันทึกน้ำหนักที่ได้ของตัวอย่างก่อนอบแห้ง (A)

1.3 นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.4 ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน และบันทึกน้ำหนักที่ได้ของตัวอย่างหลังอบแห้ง (B)

คำนวณค่าความชื้น ดังนี้

$$\% \text{ ความชื้น} = [(A-B)/A] \times 100$$

2. วิธีหาปริมาณเถ้า (Ash content) A.O.A.C. 1980 - 14.006

2.1 นำ crucible ไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

2.2 ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของ crucible จากนั้นใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 2 กรัม ให้ละเอียดถึงเทคนิคตำแหน่งที่ 4 (คือมีความผิดพลาดน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัม) ใน crucible บันทึกน้ำหนักที่ได้ของตัวอย่างก่อนเผา

2.3 นำไปเผาในตู้ควัน จนควันสีดำหมด

2.4 นำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

2.5 ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน และบันทึกน้ำหนักที่ได้ของตัวอย่างหลังอบแห้ง

คำนวณหาปริมาณเถ้า ดังนี้

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{เถ้า}) - \text{น้ำหนัก crucible}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}} \times 100$$

3. การหาปริมาณไขมัน (Soxhlet method) A.O.A.C. 1980 ข้อ 7.056

3.1 ชั่งตัวอย่างแห้ง 2-3 กรัม (ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ห่อด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปใส่ใน thimble ใน extraction tube ของ Soxhlet apparatus

3.2 ใส่ปิโตรเลียมอีเทอร์ประมาณ 200 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

3.3 นำไป reflux บน water bath อุณหภูมิประมาณ 65-70 องศาเซลเซียส โดยให้อัตราการกลั่นตัวของปิโตรเลียมอีเทอร์ 2-3 หยดต่อวินาที ใช้เวลาในการ reflux ประมาณ 10 ชั่วโมง

3.4 ระบายเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากขวดก้นกลมที่สกัดไขมัน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าจะมีน้ำหนักคงที่แน่นอน

คำนวณหาปริมาณไขมัน ดังนี้

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{(\text{น้ำหนักขวดก้นกลม} + \text{ไขมัน}) - \text{น้ำหนักขวดก้นกลม}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}} \times 100$$

4. การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

การเตรียมเพลตเคานต์อะการ์ (plate count agar)

ทริปโตน	5	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	2.5	กรัม
เดกซ์โตรส	1	กรัม
อะการ์	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายให้หมดแบ่งใส่หลอดทดลองหรือขวดแก้ว ปิดจุก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

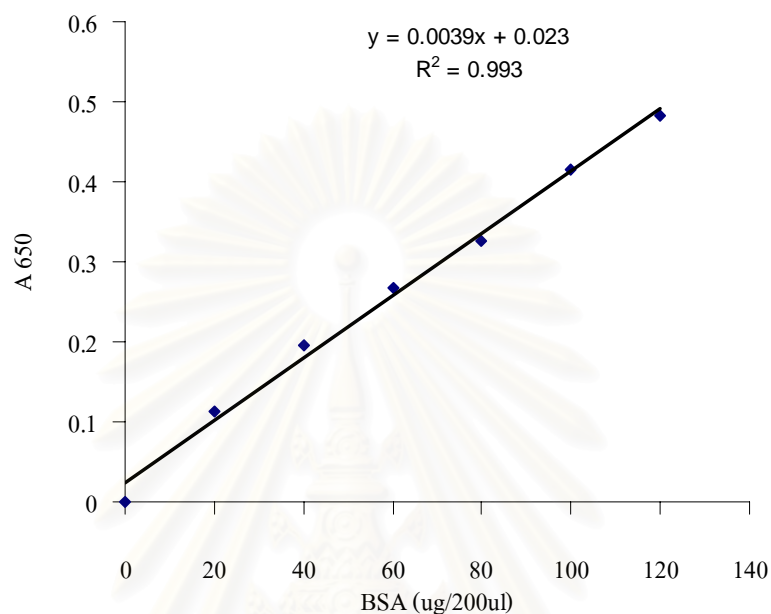
15 นาที (ควรมีความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายประมาณ 7.0) เมื่อได้แล้วนำมาเทใส่ขวด ๗ ละ 20 มิลลิลิตร รอนุ่นแห้งตัวแล้วจึงนำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาเกลี่ยลงบนผิววุ้น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส



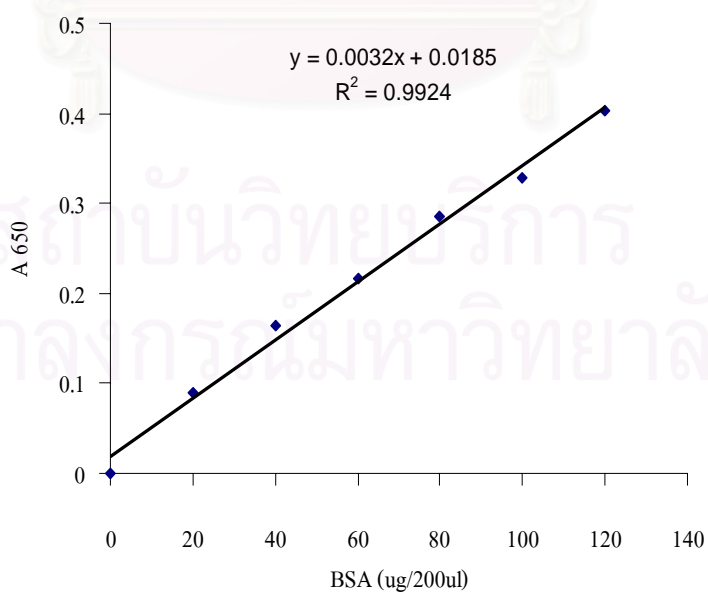
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

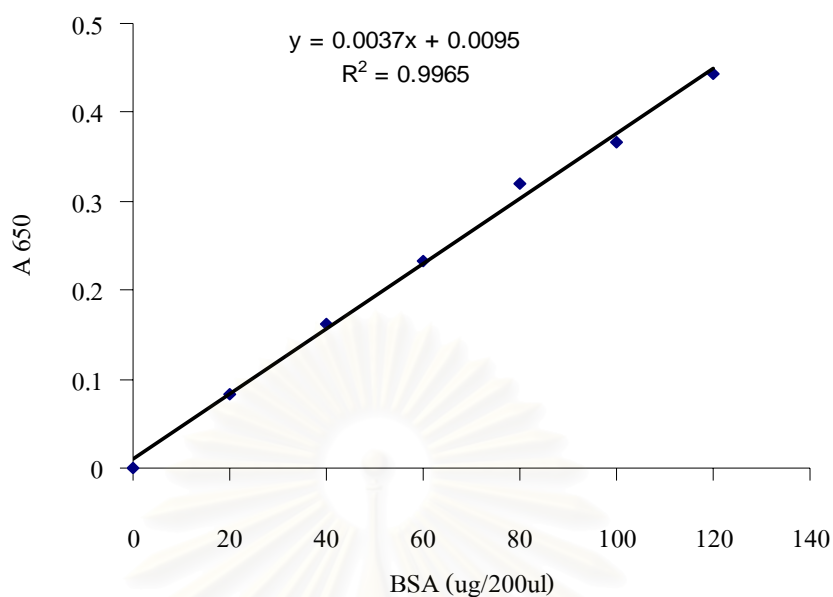
กราฟมาตรฐาน



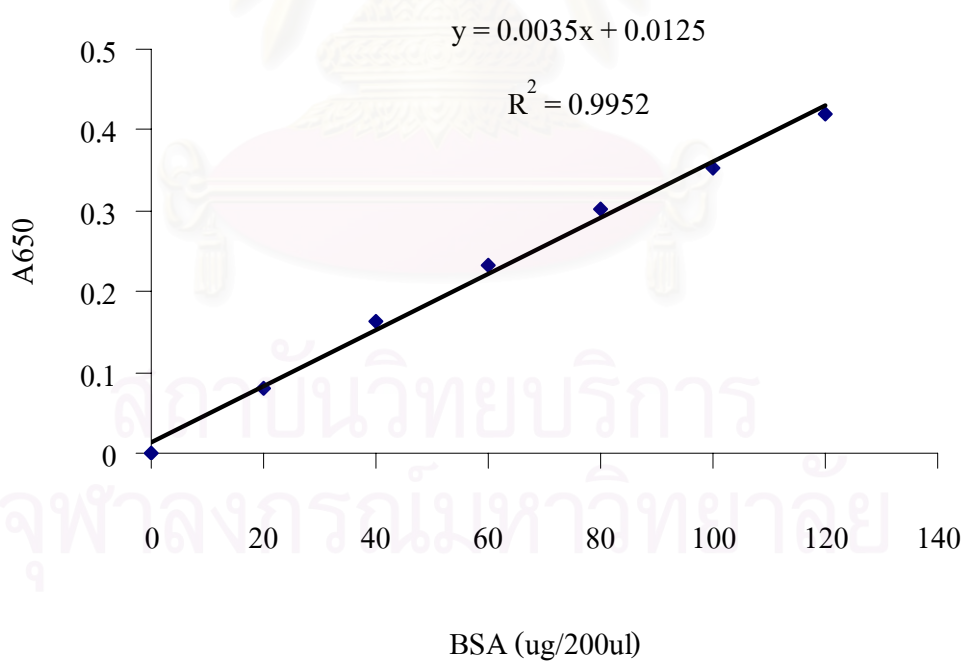
รูปที่ ง.1 แสดงกราฟมาตรฐาน BSA ของการวัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Lowry's ของแต่ละดินที่ได้จากการสกัดที่ pH 8 และ 9.5 ที่เวลา ความเข้มข้นของเอนไซม์ และอุณหภูมิต่าง ๆ



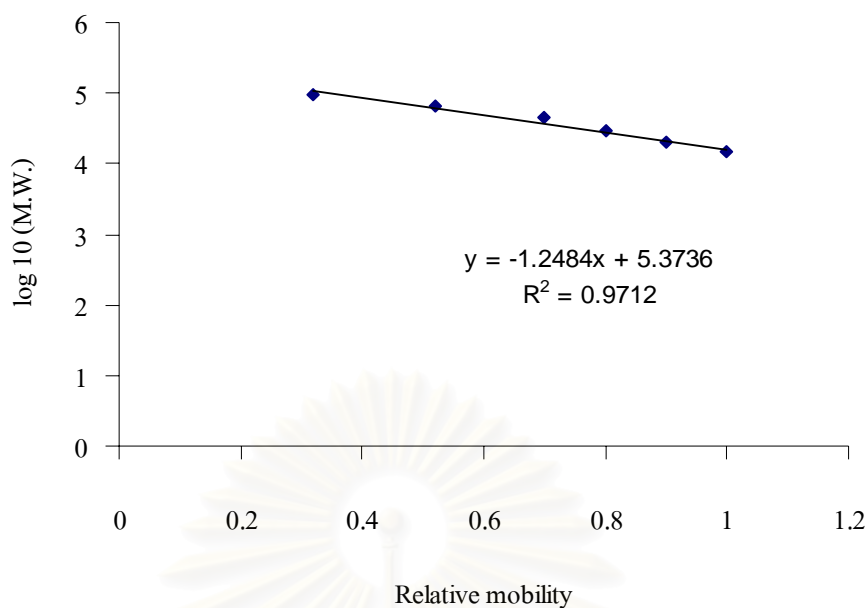
รูปที่ ง.2 แสดงกราฟมาตรฐาน BSA ของการวัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Lowry's ของตัวอย่างหนึ่งแห่ง และแต่ละดินมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง



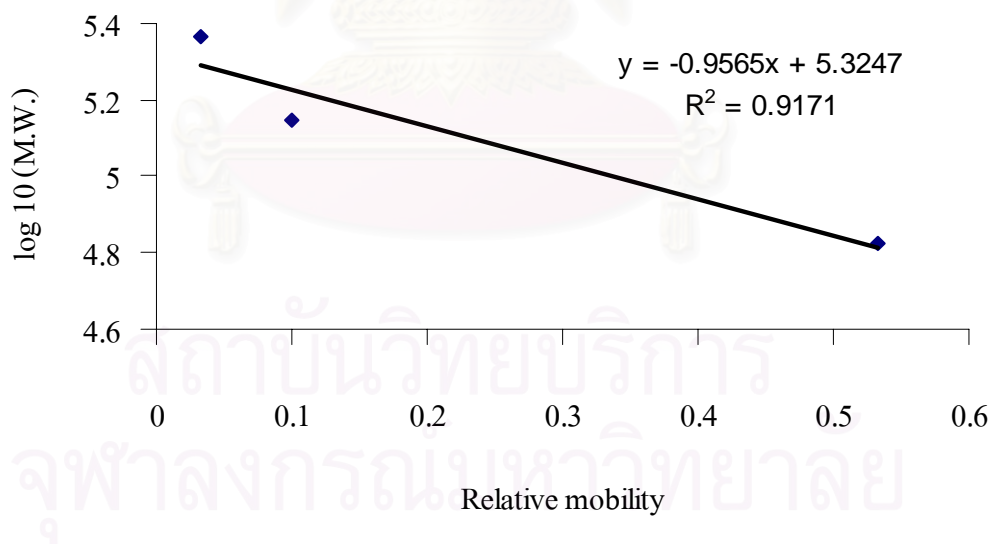
รูปที่ ง.3 แสดงกราฟมาตรฐาน BSA ของการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's ของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ pH 11 ที่เวลา ความเข้มข้นของเอนไซม์ และอุณหภูมิต่าง ๆ



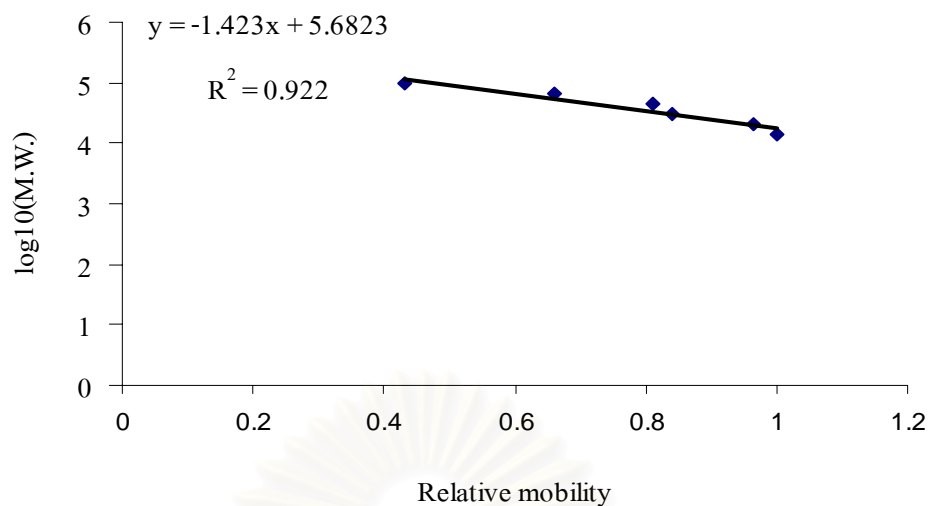
รูปที่ ง.4 แสดงกราฟมาตรฐาน BSA ของการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's



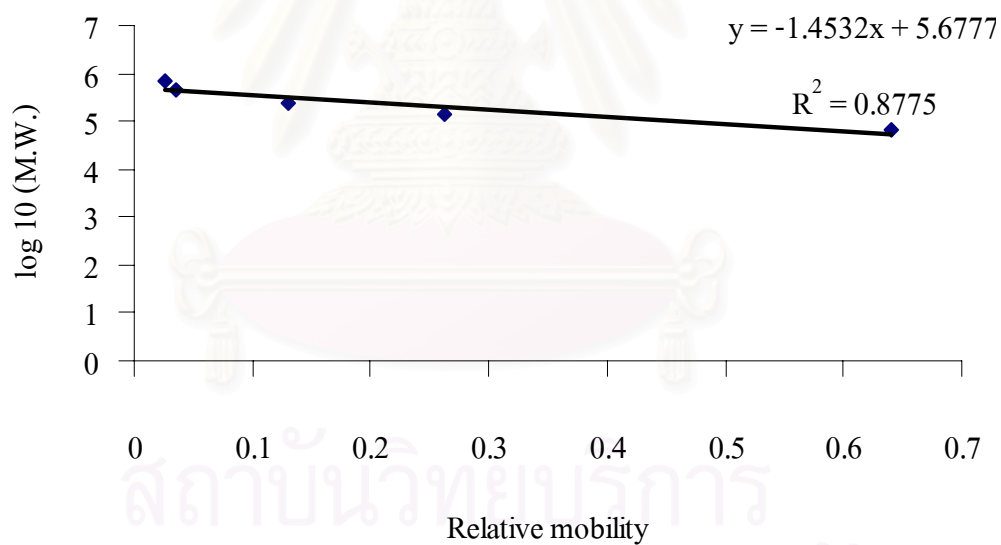
รูปที่ 3.5 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE



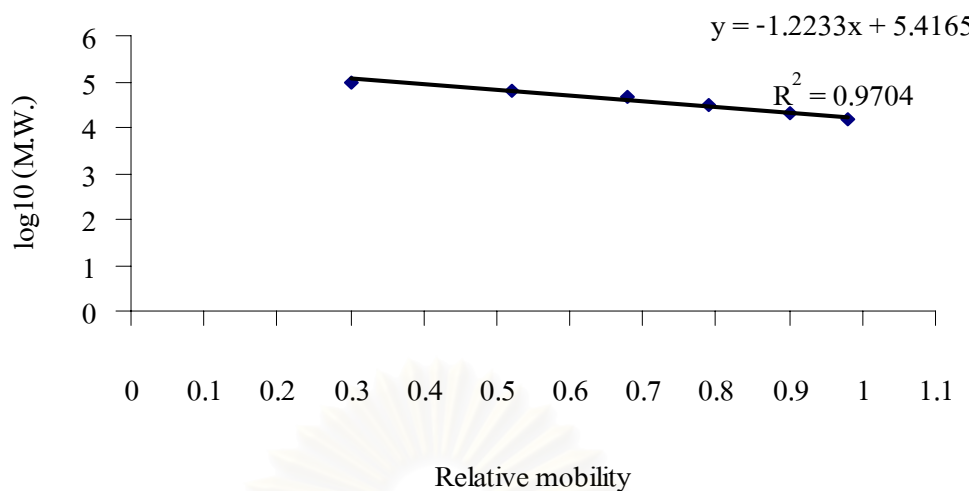
รูปที่ 3.6 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE



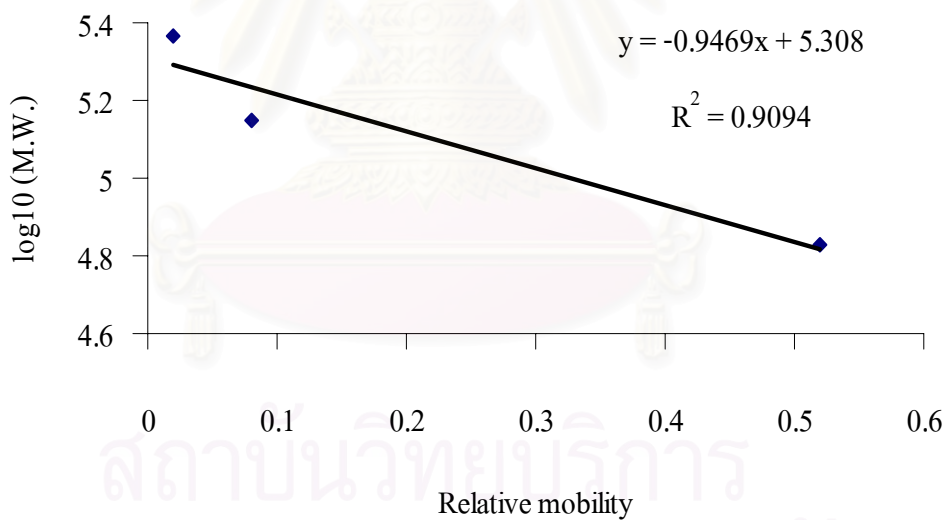
รูปที่ ๗.๗ แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE



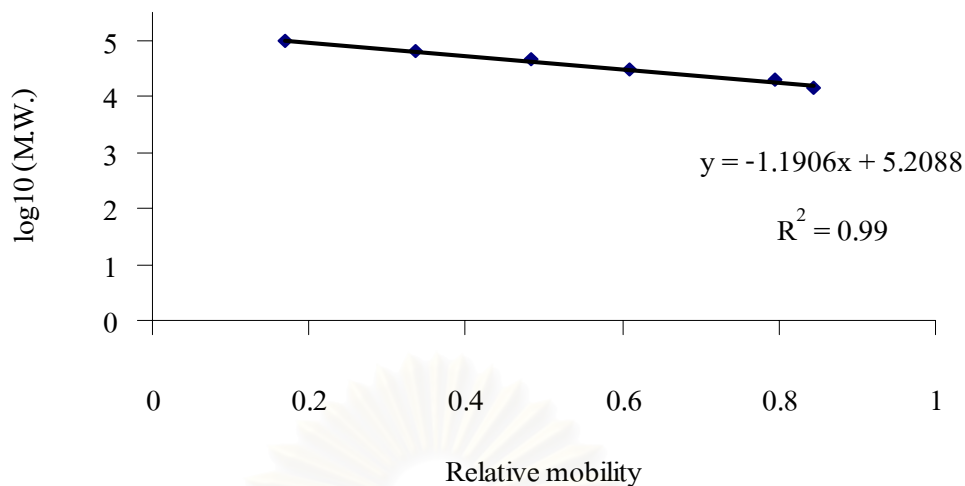
รูปที่ ๗.๘ แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE



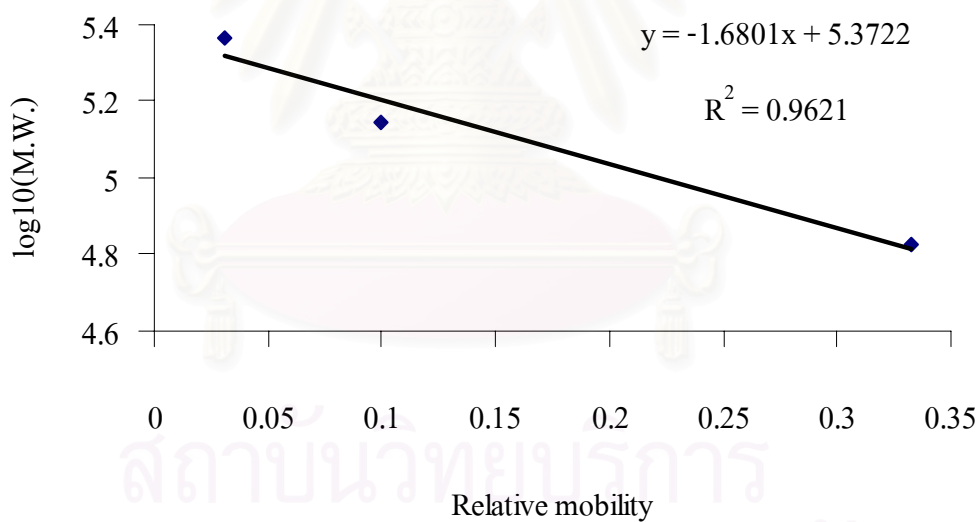
รูปที่ ๙.๙ แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE



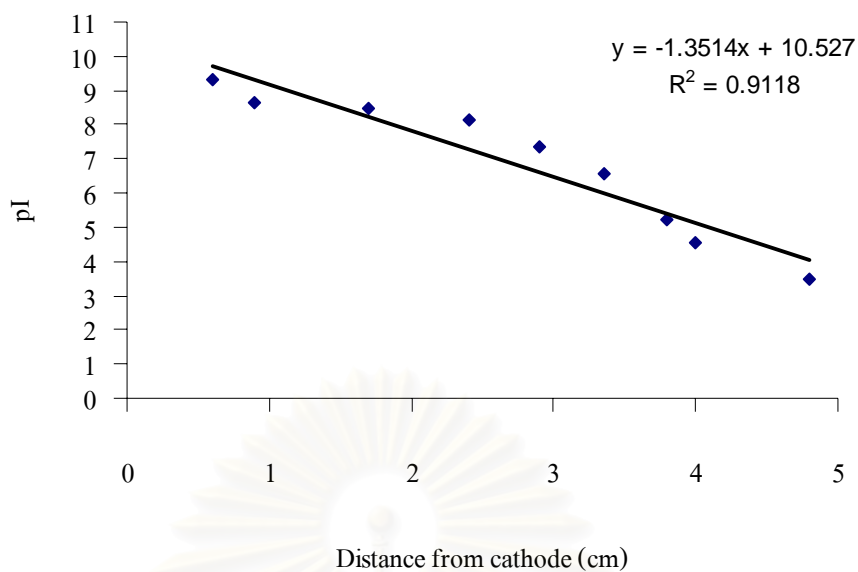
รูปที่ ๙.๑๐ แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 11.11 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 11.12 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี Native-PAGE



รูปที่ ง.13 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของ pI (เมื่อวัดระยะทางการเคลื่อนที่จากขั้วบวกไปยังขั้วลบ) ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่และค่า pI ด้วยวิธี IEF

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ จ.1 น้ำหนักของเจลดินหลังจากการทำแห้งที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 อัตราคววน 100 รอบต่อนาที

เวลา (นาที)	Volume (ml)	Dry Weight Recovery (%)						
		ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเจลดิน						
		non enzyme	200 U/mg	1,000 U/mg	3,000 U/mg	5,000 U/mg	7,500 U/mg	10,000 U/mg
20	200	17.01	17.55	17.98	19.54	19.60	18.71	20.56
40	200	18.73	18.78	20.47	22.99	28.20	24.25	25.11
60	200	20.54	20.41	22.56	26.77	32.86	27.85	28.93
80	200	22.21	22.40	26.31	30.50	33.29	32.10	33.05
100	200	24.14	25.32	28.81	33.87	37.89	35.94	38.29
120	200	26.27	26.94	30.19	37.46	46.64	41.35	40.04
140	200	28.65	28.64	35.82	41.39	51.50	43.07	49.78
160	200	32.69	32.16	40.93	47.29	53.28	48.74	54.79
180	200	40.11	36.80	48.51	56.32	58.39	53.00	61.03

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ.2 ปริมาณโปรตีนของเจละตินหลังจากการทำแห้งที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 อัตราคววน 100 รอบต่อนาที

เวลา (นาที)	Protein Recovery (%)						
	ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเจละติน						
	non enzyme	200 U/mg	1,000 U/mg	3,000 U/mg	5,000 U/mg	7,500 U/mg	10,000 U/mg
20	9.08	6.47	8.23	12.48	15.68	15.03	21.57
40	10.58	9.21	10.84	13.13	19.80	20.13	26.40
60	13.07	12.61	15.94	17.19	24.70	23.92	30.78
80	16.20	17.19	21.76	24.50	29.34	30.19	35.36
100	19.73	23.00	26.08	32.29	38.76	36.14	41.43
120	22.88	25.36	31.43	36.47	50.06	41.83	48.62
140	26.67	28.23	36.67	41.57	57.96	45.22	56.80
160	32.81	33.39	43.39	51.30	60.98	51.50	65.09
180	42.02	40.13	53.33	63.98	70.91	58.30	72.74

ตารางที่ จ.3 ค่าความแข็งแรงของเจล ของเจลละตินที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองที่ 50 °C pH 8.0

เวลา (นาที)	ความแข็งแรงของเจลของเจลละตินที่ได้ (g Bloom)						
	ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเจลละติน						
	non enzyme	200 U/mg	1,000 U/mg	3,000 U/mg	5,000 U/mg	7,500 U/mg	10,000 U/mg
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	17.6 ± 0.0	19.7 ± 0.9	15.3 ± 0.3	16.7 ± 0.6	32.9 ± 3.0	9.0 ± 0.0	ND
40	25.7 ± 0.9	29.4 ± 1.3	29.2 ± 0.2	26.8 ± 0.1	37.30 ± 0.2	20.2 ± 0.4	ND
60	37.8 ± 0.6	40.9 ± 0.8	46.5 ± 0.8	30.3 ± 2.8	46.5 ± 0.1	14.8 ± 0.1	ND
80	47.4 ± 0.2	53.7 ± 0.6	64.3 ± 1.6	36.3 ± 2.8	56.8 ± 0.0	27.0 ± 0.0	ND
100	53.2 ± 3.10.3	66.6 ± 2.1	74.7 ± 1.4	41.1 ± 0.9	59.9 ± 0.6	13.0 ± 0.4	ND
120	67.7 ± 3.8	83.7 ± 1.2	92.1 ± 0.8	35.6 ± 0.8	40.8 ± 1.8	13.0 ± 0.0	ND
140	81.1 ± 5.9	98.9 ± 0.8	80.8 ± 6.2	45.8 ± 2.4	45.2 ± 4.9	19.1 ± 1.7	ND
160	96.9 ± 8.6	115.8 ± 1.9	123.6 ± 0.2	49.9 ± 0.8	42.5 ± 0.2	9.3 ± 0.1	ND
180	118.3 ± 2.0	129.9 ± 3.3	129.6 ± 2.8	38.3 ± 0.0	19.1 ± 0.0	ND	ND

ตารางที่ จ.4 ความหนืดของเจลละตินที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองที่ 50 °C pH 8.0

เวลา (นาที)	ความหนืดของเจลละตินที่ได้ (cP)						
	ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดเจลละติน						
	non enzyme	200 U/mg	1,000 U/mg	3,000 U/mg	5,000 U/mg	7,500 U/mg	10,000 U/mg
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	1.21 ± 0.06	1.21 ± 0.00	1.08 ± 0.02	1.07 ± 0.02	1.12 ± 0.02	1.31 ± 0.00	1.07 ± 0.00
40	1.34 ± 0.02	1.36 ± 0.00	1.22 ± 0.04	1.19 ± 0.02	1.17 ± 0.00	1.29 ± 0.09	1.31 ± 0.16
60	1.49 ± 0.06	1.43 ± 0.01	1.38 ± 0.04	1.27 ± 0.02	1.30 ± 0.00	1.30 ± 0.01	1.26 ± 0.14
80	1.70 ± 0.04	1.61 ± 0.04	1.49 ± 0.02	1.33 ± 0.03	1.46 ± 0.03	1.29 ± 0.09	1.28 ± 0.30
100	1.87 ± 0.01	1.71 ± 0.02	1.60 ± 0.00	1.44 ± 0.02	1.49 ± 0.00	1.26 ± 0.03	1.49 ± 0.03
120	2.15 ± 0.01	1.79 ± 0.01	1.71 ± 0.00	1.43 ± 0.00	1.33 ± 0.02	1.19 ± 0.00	1.16 ± 0.06
140	2.38 ± 0.14	1.88 ± 0.02	1.57 ± 0.01	1.51 ± 0.00	1.42 ± 0.08	1.44 ± 0.11	1.46 ± 0.07
160	2.55 ± 0.04	2.13 ± 0.07	2.05 ± 0.02	1.59 ± 0.02	1.44 ± 0.04	1.28 ± 0.01	1.14 ± 0.02
180	2.91 ± 0.03	2.25 ± 0.04	2.20 ± 0.04	1.52 ± 0.04	1.33 ± 0.08	1.30 ± 0.19	1.20 ± 0.02

ตารางที่ จ.5 น้ำหนักแห้งของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	Dry Weight Recovery (%)								
	Concentration of enzyme 200 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	15.98	18.11	22.50	15.48	18.90	21.12	17.69	20.10	23.50
40	16.69	20.98	27.39	16.38	20.57	25.09	18.67	21.99	27.51
60	18.06	22.74	30.59	16.68	24.20	29.45	18.80	24.62	29.37
80	18.21	24.88	35.19	18.52	26.51	32.65	19.54	26.38	34.01
100	19.71	28.53	39.18	18.89	31.13	39.24	21.08	29.80	38.09
120	20.38	31.55	43.27	19.77	34.24	43.45	22.00	32.64	43.67
140	22.10	35.34	51.37	21.24	36.49	50.94	24.24	36.39	50.90
160	24.20	40.30	61.37	23.40	43.21	64.64	25.78	42.09	57.78
180	25.93	44.87	78.23	26.49	50.53	85.10	29.35	53.33	73.19

ตาราง จ.6 น้ำหนักแห้งของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	Dry weigh Recovery (%)								
	Concentration of enzyme 5000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	17.54	19.20	23.57	17.29	19.79	22.48	17.34	21.45	23.91
40	18.71	24.33	29.55	20.25	24.87	28.61	19.19	25.73	27.74
60	23.18	27.65	34.20	22.81	29.34	34.00	21.50	29.49	31.46
80	25.31	32.35	38.04	25.02	33.24	37.48	23.58	33.65	36.34
100	25.41	34.95	42.47	29.01	37.40	42.87	26.44	37.13	44.03
120	27.06	39.35	47.24	31.68	42.19	47.96	29.71	41.89	46.81
140	29.69	44.15	52.38	35.03	45.86	54.97	32.93	46.90	54.60
160	31.01	50.34	59.62	36.97	51.38	62.29	37.92	51.36	63.33
180	32.95	58.75	71.83	40.54	56.68	76.75	43.74	58.32	73.22

ตาราง จ.7 น้ำหนักแห้งของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	Dry weigh Recovery (%)								
	Concentration of enzyme 10,000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	15.31	21.38	26.75	18.54	21.84	26.57	18.22	21.31	23.82
40	20.50	27.08	33.12	20.66	27.78	32.96	21.35	25.79	25.38
60	22.38	32.50	37.59	24.50	32.93	38.76	23.43	30.49	28.98
80	24.54	36.28	40.54	28.67	38.30	43.65	25.77	35.95	32.98
100	25.30	39.87	41.14	32.81	41.86	46.84	28.96	40.57	38.41
120	28.59	45.27	45.28	36.67	46.64	52.16	31.97	41.33	42.06
140	32.26	48.96	53.66	39.85	49.80	56.90	33.87	48.44	49.28
160	35.32	54.86	62.28	41.70	47.85	65.49	38.06	53.77	57.22
180	39.54	61.89	76.81	46.68	61.49	78.81	44.84	62.84	78.89

ตาราง จ.8 น้ำหนักแห้งของเจละดินที่ได้จากการสกัดโดยใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH

Time (min)	Dry weigh Recovery (%)								
	Non enzyme								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	16.84	19.60	20.65	16.57	18.37	21.83	16.92	20.66	22.11
40	17.38	21.43	23.57	17.03	19.93	24.58	17.62	24.99	24.86
60	18.19	23.17	26.06	16.79	21.39	27.76	18.31	24.18	27.85
80	19.00	25.55	29.46	18.13	22.81	31.12	19.51	26.01	31.72
100	19.45	26.94	33.42	18.47	24.41	33.56	20.23	27.93	35.61
120	20.24	31.48	37.32	19.67	26.25	38.12	20.40	28.61	40.39
140	20.71	32.50	42.26	21.13	29.55	45.24	20.52	33.98	46.11
160	22.17	36.11	50.33	22.20	33.06	51.10	21.49	37.97	57.26
180	24.23	45.04	62.19	24.92	37.79	61.86	23.15	45.66	69.21

ตารางที่ จ.9 ปริมาณโปรตีนของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	Protein Recovery (%)								
	Concentration of enzyme 200 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	4.64	5.29	14.38	8.95	7.06	7.97	2.16	5.56	6.73
40	5.81	10.84	19.80	10.19	11.50	11.70	3.27	7.51	9.01
60	7.58	15.68	25.88	10.98	16.92	16.67	3.79	10.00	11.11
80	10.84	19.54	32.68	13.46	24.58	21.76	4.24	11.76	13.66
100	12.88	23.59	39.48	14.83	35.42	31.90	5.56	17.25	15.68
120	18.36	28.88	45.62	16.33	39.80	37.51	6.86	20.84	20.78
140	21.83	35.16	55.88	19.34	44.31	52.16	9.15	25.68	33.86
160	26.14	44.64	71.04	24.70	50.52	69.01	11.30	31.83	44.44
180	30.65	53.07	81.18	28.49	60.26	80.59	15.29	42.61	66.27

ตาราง จ.10 ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	Protein Recovery (%)								
	Concentration of enzyme 5000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	9.35	15.56	16.60	10.00	15.57	16.01	2.22	10.92	12.81
40	11.50	20.98	22.61	12.81	20.65	20.78	3.53	13.66	16.34
60	16.67	25.56	27.97	15.23	25.62	16.21	5.10	16.27	20.07
80	19.74	31.44	32.29	18.37	29.22	30.07	8.10	19.35	26.01
100	21.83	36.41	37.84	23.37	34.38	37.91	12.48	22.22	34.12
120	24.84	42.22	45.56	29.08	41.83	46.41	17.45	29.41	38.17
140	29.28	48.22	53.66	35.16	49.82	57.65	21.70	34.51	49.41
160	33.86	58.95	67.84	41.44	57.65	68.10	30.33	46.80	60.85
180	38.95	70.72	84.90	48.30	67.71	88.76	39.87	58.69	74.12

ตาราง จ.11 ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	Protein Recovery (%)								
	Concentration of enzyme 10,000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	5.88	15.42	20.13	12.16	14.97	16.99	6.01	7.58	12.55
40	9.02	20.72	27.12	15.29	23.40	23.07	8.63	9.74	14.12
60	12.42	26.14	32.94	19.80	28.50	32.81	11.63	12.55	17.52
80	15.82	30.46	39.41	25.03	40.46	40.00	16.73	15.29	20.72
100	21.37	34.18	43.01	28.95	45.23	49.93	21.57	17.65	25.75
120	25.88	40.20	43.53	33.79	51.18	56.34	25.23	27.12	32.75
140	31.05	46.41	60.07	39.54	56.01	63.73	29.48	38.24	42.35
160	37.84	57.71	71.76	45.03	54.84	74.51	34.18	47.52	51.57
180	46.21	73.01	92.42	55.29	72.09	93.07	42.22	61.96	78.69

ตาราง จ.12 แสดงปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	Protein Recovery (%)								
	Non enzyme								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	7.45	11.24	16.01	7.84	16.08	15.69	4.12	12.03	9.80
40	8.50	14.05	20.00	8.76	18.50	20.13	5.29	13.07	12.29
60	10.78	17.71	23.66	8.95	20.26	22.22	6.34	14.84	16.80
80	12.94	21.37	29.08	11.44	22.09	33.73	7.91	17.19	21.90
100	16.01	23.01	36.01	13.33	24.25	37.97	9.22	19.15	26.08
120	17.32	29.02	41.31	15.69	27.45	44.38	9.87	21.18	33.27
140	18.04	30.59	48.24	18.43	32.16	53.33	10.59	27.58	42.42
160	20.59	36.34	57.71	20.92	36.80	60.65	11.57	32.68	55.29
180	23.27	47.06	72.94	24.64	43.40	69.28	13.07	40.98	74.44

ตารางที่ จ.13 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	ความแข็งแรงของเจล (g Bloom)								
	Concentration of enzyme 200 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	ND	19.4 ± 2.8	56.0 ± 2.0	ND	16.3 ± 0.1	34.6 ± 1.20	ND	16.9 ± 0.84	24.1 ± 0.22
40	ND	41.6 ± 1.0	84.8 ± 1.3	4.6 ± 0.3	29.2 ± 2.2	54.4 ± 1.27	ND	32.6 ± 0.28	48.8 ± 1.76
60	14.2 ± 4.1	48.1 ± 1.1	109.3 ± 1.9	11.4 ± 1.3	45.0 ± 0.1	74.1 ± 1.55	8.9 ± 1.69	39.0 ± 0.64	69.2 ± 0.14
80	15.6 ± 1.3	73.8 ± 3.9	121.4 ± 0.2	14.7 ± 1.5	58.2 ± 0.6	87.7 ± 0.70	13.7 ± 1.06	49.3 ± 5.16	78.7 ± 1.41
100	19.6 ± 0.6	83.9 ± 1.9	128.3 ± 0.1	20.4 ± 0.8	68.8 ± 1.2	95.6 ± 1.27	18.3 ± 3.39	65.1 ± 5.44	107.7 ± 2.61
120	18.8 ± 0.5	95.4 ± 1.8	152.0 ± 2.1	28.7 ± 0.5	82.8 ± 8.2	101.7 ± 2.33	22.8 ± 0.10	76.4 ± 0.98	108.9 ± 4.94
140	23.9 ± 0.4	121.0 ± 7.6	161.6 ± 5.8	33.8 ± 1.2	94.6 ± 5.3	121.6 ± 2.46	27.7 ± 1.13	90.0 ± 3.88	115.0 ± 2.76
160	43.1 ± 0.6	115.0 ± 3.8	155.6 ± 1.2	37.6 ± 0.5	111.9 ± 6.9	124.0 ± 10.39	31.4 ± 2.33	100.7 ± 4.03	139.2 ± 2.36
180	60.3 ± 1.0	158.0 ± 1.4	160.0 ± 5.9	54.2 ± 2.6	124.8 ± 12.8	141.8 ± 5.79	48.3 ± 3.25	126.1 ± 5.44	126.4 ± 4.59

ตารางที่ จ.14 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	ความแข็งแรงของเจล (g Bloom)								
	Concentration of enzyme 5,000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	ND	ND	53.7 ± 1.1	ND	25.3 ± 2.0	42.2 ± 0.8	ND	14.1 ± 0.3	44.5 ± 2.1
40	12.4 ± 0.8	27.0 ± 0.2	77.8 ± 3.6	11.1 ± 0.1	32.3 ± 0.6	59.2 ± 1.0	ND	23.8 ± 1.2	57.7 ± 0.1
60	11.4 ± 0.3	8.0 ± 0.6	80.8 ± 3.8	15.0 ± 0.1	40.4 ± 0.8	74.6 ± 1.3	5.6 ± 0.2	30.9 ± 0.6	74.2 ± 1.4
80	17.3 ± 0.6	23.4 ± 2.3	97.0 ± 0.0	20.1 ± 0.7	40.0 ± 1.2	81.0 ± 2.6	5.6 ± 0.0	29.4 ± 0.6	79.9 ± 3.0
100	ND	40.0 ± 3.4	90.1 ± 0.2	21.2 ± 2.8	42.9 ± 0.1	85.0 ± 2.6	13.0 ± 0.3	33.1 ± 2.3	77.8 ± 3.0
120	ND	40.8 ± 4.3	99.1 ± 2.0	25.5 ± 1.4	40.8 ± 3.3	91.3 ± 2.2	18.2 ± 0.1	33.0 ± 1.2	106.1 ± 4.6
140	ND	41.3 ± 0.0	88.4 ± 3.8	26.8 ± 0.8	39.3 ± 1.0	95.2 ± 3.8	21.9 ± 1.6	37.6 ± 3.1	105.1 ± 1.6
160	ND	43.4 ± 2.4	91.8 ± 1.0	31.7 ± 3.8	43.4 ± 4.3	107.3 ± 2.4	24.3 ± 1.3	44.3 ± 0.3	125.2 ± 0.8
180	ND	28.8 ± 5.8	81.7 ± 2.1	33.1 ± 0.8	38.2 ± 2.1	107.2 ± 1.6	30.7 ± 0.1	46.3 ± 4.1	141.1 ± 7.1

ตารางที่ จ.15 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	ความแข็งแรงของเจล (g Bloom)								
	Concentration of enzyme 10,000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	ND	ND	49.3 ± 1.9	ND	11.7 ± 0.0	33.0 ± 2.2	ND	12.1 ± 1.2	33.0 ± 0.6
40	ND	9.8 ± 2.8	67.8 ± 1.0	ND	15.6 ± 1.0	48.5 ± 0.8	ND	16.2 ± 0.7	52.2 ± 3.4
60	ND	17.4 ± 1.8	74.8 ± 1.8	ND	14.6 ± 1.6	45.8 ± 1.0	ND	17.5 ± 0.8	65.1 ± 1.4
80	ND	15.8 ± 3.1	75.2 ± 1.9	ND	13.9 ± 0.3	54.8 ± 0.2	6.9 ± 0.2	19.2 ± 0.6	79.0 ± 3.2
100	ND	18.7 ± 0.0	81.6 ± 6.1	7.4 ± 1.0	14.0 ± 0.2	59.5 ± 1.6	6.7 ± 0.8	19.4 ± 1.8	93.9 ± 1.4
120	ND	10.8 ± 0.4	80.1 ± 2.1	8.0 ± 2.1	10.4 ± 0.5	59.4 ± 0.7	8.4 ± 0.2	22.0 ± 4.8	101.2 ± 1.6
140	ND	10.4 ± 0.2	80.2 ± 2.4	9.8 ± 1.3	9.7 ± 0.4	64.3 ± 0.2	10.9 ± 0.2	22.2 ± 1.9	107.3 ± 4.3
160	ND	7.9 ± 0.1	70.5 ± 4.6	9.2 ± 1.0	6.9 ± 0.8	63.9 ± 2.6	12.0 ± 1.2	25.0 ± 0.1	120.4 ± 2.1
180	ND	9.0 ± 0.3	73.8 ± 4.1	ND	ND	65.2 ± 1.83	13.0 ± 2.6	24.3 ± 2.3	128.6 ± 6.1

ตารางที่ จ.16 ค่าความแข็งแรงของเจลละตินที่ได้จากการสกัดโดยไม้อื่นไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	ความแข็งแรงของเจล (g Bloom)								
	Non enzyme								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	ND	25.2 ± 0.8	41.0 ± 0.6	ND	22.7 ± 0.2	38.4 ± 0.1	ND	14.8 ± 1.0	24.8 ± 0.1
40	ND	34.2 ± 0.3	50.1 ± 3.1	6.8 ± 0.1	27.4 ± 0.2	51.6 ± 4.8	ND	23.1 ± 0.4	32.0 ± 1.0
60	8.0 ± 1.2	44.7 ± 3.6	69.8 ± 2.9	11.2 ± 0.1	38.4 ± 1.4	57.3 ± 6.8	ND	29.5 ± 0.2	49.5 ± 3.5
80	11.2 ± 2.0	24.1 ± 0.4	78.4 ± 3.6	16.4 ± 0.1	51.0 ± 0.2	70.0 ± 1.2	10.2 ± 0.4	39.0 ± 1.0	66.1 ± 2.0
100	14.2 ± 2.6	59.3 ± 1.8	84.6 ± 7.8	19.3 ± 1.9	51.9 ± 0.7	75.1 ± 4.5	11.3 ± 0.8	48.4 ± 2.2	79.7 ± 0.7
120	18.7 ± 0.2	38.9 ± 1.0	97.1 ± 3.5	27.3 ± 0.3	59.3 ± 1.9	79.2 ± 1.3	12.4 ± 0.2	62.9 ± 13.8	82.4 ± 3.4
140	24.0 ± 1.4	71.5 ± 3.9	113.9 ± 2.6	30.7 ± 2.6	79.9 ± 3.3	90.3 ± 3.2	15.6 ± 0.6	68.6 ± 4.1	104.0 ± 6.0
160	26.0 ± 3.0	80.2 ± 0.1	127.0 ± 3.6	36.8 ± 1.9	96.3 ± 11.1	114.7 ± 16.4	22.5 ± 0.8	82.4 ± 3.2	88.9 ± 11.3
180	29.1 ± 0.8	99.2 ± 2.8	165.8 ± 6.6	50.6 ± 2.4	114.0 ± 7.8	124.1 ± 0.4	28.5 ± 0.6	106.0 ± 2.9	148.3 ± 4.1

ตารางที่ จ.17 ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	ความหนืด (cP)								
	Concentration of enzyme 200 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	1.65 ± 0.07	1.73 ± 0.04	2.06 ± 0.06	1.68 ± 0.02	1.78 ± 0.02	1.99 ± 0.05	1.63 ± 0.04	1.79 ± 0.00	2.05 ± 0.04
40	1.60 ± 0.08	1.89 ± 0.04	2.29 ± 0.07	1.70 ± 0.00	1.90 ± 0.02	2.13 ± 0.07	1.70 ± 0.00	1.90 ± 0.02	2.21 ± 0.00
60	1.76 ± 0.04	1.92 ± 0.00	2.43 ± 0.04	1.76 ± 0.00	1.98 ± 0.00	2.34 ± 0.05	1.71 ± 0.02	1.97 ± 0.07	2.40 ± 0.00
80	1.73 ± 0.00	2.20 ± 0.02	2.44 ± 0.02	1.70 ± 0.00	2.08 ± 0.00	2.42 ± 0.11	1.73 ± 0.04	2.12 ± 0.02	2.53 ± 0.00
100	1.79 ± 0.00	2.32 ± 0.02	2.48 ± 0.02	1.82 ± 0.00	2.12 ± 0.02	2.47 ± 0.05	1.76 ± 0.04	2.18 ± 0.05	2.72 ± 0.04
120	1.78 ± 0.06	2.16 ± 0.07	2.59 ± 0.04	1.92 ± 0.00	2.26 ± 0.02	2.59 ± 0.00	1.80 ± 0.02	2.39 ± 0.06	2.78 ± 0.00
140	1.84 ± 0.02	2.27 ± 0.04	2.64 ± 0.07	1.95 ± 0.00	2.39 ± 0.02	2.66 ± 0.05	1.90 ± 0.02	2.44 ± 0.02	2.83 ± 0.02
160	1.89 ± 0.00	2.22 ± 0.02	2.62 ± 0.05	2.02 ± 0.00	2.44 ± 0.02	2.69 ± 0.00	1.95 ± 0.00	2.56 ± 0.04	3.01 ± 0.00
180	1.96 ± 0.02	2.36 ± 0.09	2.43 ± 0.00	2.14 ± 0.00	2.48 ± 0.02	2.74 ± 0.02	2.07 ± 0.02	2.58 ± 0.02	3.07 ± 0.04

ตารางที่ จ.18 ค่าความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	ความหนืด (cP)								
	Concentration of enzyme 5,000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	1.65 ± 0.07	1.73 ± 0.04	2.06 ± 0.06	1.68 ± 0.02	1.78 ± 0.02	1.99 ± 0.05	1.71 ± 0.02	1.82 ± 0.00	2.05 ± 0.04
40	1.60 ± 0.08	1.89 ± 0.04	2.29 ± 0.07	1.70 ± 0.00	1.90 ± 0.02	2.13 ± 0.07	1.71 ± 0.02	1.89 ± 0.00	2.21 ± 0.00
60	1.76 ± 0.04	1.92 ± 0.00	2.43 ± 0.04	1.76 ± 0.00	1.98 ± 0.00	2.34 ± 0.05	1.76 ± 0.00	1.95 ± 0.00	2.40 ± 0.00
80	1.73 ± 0.00	2.20 ± 0.02	2.44 ± 0.02	1.70 ± 0.00	2.08 ± 0.00	2.42 ± 0.11	1.82 ± 0.00	2.05 ± 0.04	2.53 ± 0.00
100	1.79 ± 0.00	2.32 ± 0.02	2.48 ± 0.02	1.82 ± 0.00	2.12 ± 0.02	1.47 ± 0.05	1.86 ± 0.00	2.10 ± 0.02	2.72 ± 0.04
120	1.78 ± 0.06	2.16 ± 0.07	2.59 ± 0.04	1.92 ± 0.00	2.26 ± 0.02	2.59 ± 0.00	1.89 ± 0.00	2.11 ± 0.00	2.78 ± 0.00
140	1.84 ± 0.02	2.27 ± 0.04	2.64 ± 0.07	1.95 ± 0.00	2.39 ± 0.02	2.66 ± 0.05	1.90 ± 0.02	2.21 ± 0.00	2.83 ± 0.02
160	1.89 ± 0.00	2.22 ± 0.02	2.62 ± 0.05	2.02 ± 0.00	2.44 ± 0.02	2.69 ± 0.00	1.97 ± 0.02	2.21 ± 0.00	3.01 ± 0.00
180	1.96 ± 0.00	2.36 ± 0.09	2.43 ± 0.00	2.14 ± 0.00	2.48 ± 0.02	2.74 ± 0.02	2.01 ± 0.05	2.24 ± 0.00	3.07 ± 0.04

ตารางที่ จ.19 ความหนืดของเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	ความหนืด (cP)								
	Concentration of enzyme 10,000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	1.63 ± 0.00	1.73 ± 0.00	1.98 ± 0.00	1.67 ± 0.05	1.84 ± 0.02	1.97 ± 0.07	1.70 ± 0.00	1.66 ± 0.00	1.89 ± 0.00
40	1.56 ± 0.02	1.84 ± 0.02	2.12 ± 0.02	1.73 ± 0.00	1.97 ± 0.02	2.08 ± 0.00	1.79 ± 0.00	1.84 ± 0.02	2.16 ± 0.07
60	1.64 ± 0.02	1.92 ± 0.00	2.18 ± 0.00	1.78 ± 0.02	2.00 ± 0.28	2.12 ± 0.02	1.80 ± 0.02	1.86 ± 0.00	2.27 ± 0.06
80	1.71 ± 0.07	1.94 ± 0.02	2.24 ± 0.00	1.80 ± 0.02	1.96 ± 0.09	2.16 ± 0.02	1.88 ± 0.02	1.92 ± 0.00	2.48 ± 0.02
100	1.73 ± 0.00	2.00 ± 0.02	2.26 ± 0.02	1.88 ± 0.02	2.00 ± 0.28	2.24 ± 0.00	1.90 ± 0.02	1.95 ± 0.00	2.51 ± 0.02
120	1.78 ± 0.06	1.95 ± 0.00	2.24 ± 0.00	1.92 ± 0.00	2.01 ± 0.05	2.21 ± 0.04	1.93 ± 0.02	1.93 ± 0.02	2.54 ± 0.06
140	1.78 ± 0.02	1.97 ± 0.07	2.28 ± 0.02	1.98 ± 0.00	2.07 ± 0.22	2.29 ± 0.02	2.02 ± 0.00	2.00 ± 0.02	2.59 ± 0.04
160	1.80 ± 0.02	1.95 ± 0.00	2.22 ± 0.02	1.99 ± 0.05	2.04 ± 0.02	2.26 ± 0.02	1.92 ± 0.00	1.98 ± 0.00	2.69 ± 0.00
180	1.79 ± 0.00	1.95 ± 0.04	2.28 ± 0.02	1.92 ± 0.00	1.97 ± 0.02	2.30 ± 0.00	2.06 ± 0.02	1.98 ± 0.00	2.78 ± 0.05

ตารางที่ จ.20 ความหนืดของเจลาตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	ความหนืด (cP)								
	Non enzyme								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20	1.59 ± 0.06	1.89 ± 0.04	2.10 ± 0.02	1.60 ± 0.01	1.94 ± 0.02	2.08 ± 0.04	1.64 ± 0.02	1.86 ± 0.00	1.90 ± 0.02
40	1.70 ± 0.16	2.07 ± 0.02	2.26 ± 0.02	1.70 ± 0.01	2.02 ± 0.00	2.29 ± 0.02	1.66 ± 0.00	1.95 ± 0.04	1.95 ± 0.00
60	1.67 ± 0.05	2.11 ± 0.00	2.46 ± 0.00	1.73 ± 0.01	2.16 ± 0.02	2.40 ± 0.04	1.73 ± 0.00	2.05 ± 0.04	2.13 ± 0.07
80	1.71 ± 0.07	1.78 ± 0.02	2.50 ± 0.00	1.82 ± 0.01	2.31 ± 0.05	2.43 ± 0.00	1.74 ± 0.02	2.12 ± 0.02	2.27 ± 0.04
100	1.78 ± 0.02	2.32 ± 0.02	2.59 ± 0.04	1.79 ± 0.01	2.31 ± 0.05	2.53 ± 0.00	1.74 ± 0.02	2.27 ± 0.00	2.34 ± 0.00
120	1.88 ± 0.02	2.00 ± 0.07	2.54 ± 0.02	1.89 ± 0.01	2.43 ± 0.00	2.61 ± 0.07	1.74 ± 0.02	2.41 ± 0.06	2.39 ± 0.06
140	1.92 ± 0.00	2.46 ± 0.00	2.68 ± 0.02	1.92 ± 0.01	2.55 ± 0.02	2.64 ± 0.07	1.79 ± 0.00	2.43 ± 0.00	2.51 ± 0.02
160	1.88 ± 0.02	2.50 ± 0.00	2.70 ± 0.02	2.02 ± 0.01	2.58 ± 0.02	2.70 ± 0.02	1.80 ± 0.02	2.58 ± 0.02	2.40 ± 0.04
180	2.02 ± 0.00	2.60 ± 0.02	3.20 ± 0.08	2.27 ± 0.01	2.74 ± 0.02	3.00 ± 0.02	1.89 ± 0.00	2.69 ± 0.04	2.70 ± 0.02

ตารางที่ จ.21 น้ำหนักแห้ง, โปรตีน, ค่าความแข็งแรงของเจล และความหนืด ที่สูงที่สุดของเจลละติที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0

สมบัติ	Concentration of enzyme						
	Non enzyme	200 U/mg	1,000 U/mg	3,000 U/mg	5,000 U/mg	7,500 U/mg	10,000 U/mg
Dry weight Recovery(%)	40.11	36.80	48.51	56.32	58.39	53.00	61.03
Protein Recovery (%)	40.02	40.13	53.33	63.98	70.91	58.30	72.74
Gel strength (g Bloom)	118.30	129.90	129.60	38.30	19.10	1.00	1.00
Viscosity (cP)	2.91	2.25	2.20	1.52	1.33	1.30	1.20

ตารางที่ จ.22 น้ำหนักแห้ง ปริมาณ โปรตีน ความแข็งแรงของเจล และความหนืดที่สูงที่สุดของเจลละติน ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ที่เวลา 180 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

สมบัติ	Concentration of enzyme			
	Non enzyme	200 U/mg	5,000 U/mg	10,000 U/mg
Dry Weight Recovery (%)	69.20 (pH11)	85.10 (pH9.5)	76.74 (pH9.5)	78.80 (pH9.5)
Protein Recovery (%)	74.44 (pH11)	80.59 (pH9.5)	88.76 (pH9.5)	93.07 (pH9.5)
Gel strength (g Bloom)	165.8 (pH 8.0)	160.0 (pH 8.0)	141.1 (pH 11.0)	128.6 (pH 11.0)
Viscosity (cP)	3.20 (pH 8.0)	3.07 (pH 11.0)	3.07 (pH 11.0)	2.78 (pH 11.0)

ตารางที่ จ.23 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	pH*								
	Concentration of enzyme 200 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	8.46	8.52	8.78	8.74	8.76	8.85	9.67	9.64	9.44
40	8.70	8.61	8.83	8.82	8.85	8.91	9.65	9.63	9.48
60	8.80	8.68	8.85	8.90	8.84	8.94	9.76	9.65	9.49
80	8.82	8.78	8.86	8.72	8.75	8.96	9.75	9.85	9.53
100	8.84	8.79	8.87	8.81	8.76	8.87	9.75	9.73	9.50
120	8.86	8.78	8.88	9.00	8.78	8.93	9.69	9.74	9.51
140	8.82	8.83	8.78	8.78	8.90	8.96	9.70	9.68	9.44
160	8.78	8.80	8.88	8.85	8.90	8.97	9.69	9.67	9.38
180	8.89	8.80	7.79	8.94	8.90	8.90	9.71	9.65	9.38

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

ตารางที่ จ.24 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	pH*								
	Concentration of enzyme 5,000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	8.27	8.41	8.45	8.81	8.82	9.10	9.46	9.37	9.39
40	8.36	8.60	8.55	8.83	8.74	9.17	9.46	9.39	9.37
60	8.40	8.61	8.58	8.77	8.75	9.08	9.54	9.29	9.38
80	8.40	8.63	8.61	8.88	8.63	9.13	9.52	9.31	9.35
100	8.30	8.68	8.59	8.87	8.70	9.05	9.55	9.19	9.34
120	8.39	8.68	8.61	8.80	8.68	9.01	9.58	9.21	9.35
140	8.31	8.63	8.63	8.90	8.63	8.95	9.56	9.15	9.36
160	8.42	8.62	8.58	8.92	8.69	8.98	9.53	9.16	9.38
180	8.35	8.59	8.58	8.91	8.67	9.01	9.48	9.15	9.34

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

ตารางที่ จ.25 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	pH*								
	Concentration of enzyme 10,000 U/mg								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	8.34	8.31	8.54	8.53	8.82	8.64	9.37	9.45	9.21
40	8.36	8.43	8.62	9.00	8.80	8.77	9.40	9.44	9.63
60	8.49	8.47	8.68	8.86	8.75	8.83	9.41	9.40	9.60
80	8.50	8.49	8.76	8.79	8.66	8.83	9.36	9.29	9.54
100	8.46	8.50	8.74	8.80	8.65	8.85	9.32	9.31	9.58
120	8.49	8.56	8.70	8.80	8.58	8.87	9.31	9.31	9.58
140	8.48	8.51	8.78	8.88	8.58	8.96	9.29	9.28	9.54
160	8.48	8.44	8.76	8.75	8.49	8.88	9.28	9.28	9.51
180	8.43	8.44	8.78	8.60	8.46	8.94	9.25	9.27	9.53

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

ตารางที่ จ.26 ค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลาตินที่ได้จากการสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	pH*								
	Non enzyme								
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
20	8.45	8.83	8.84	8.31	8.41	8.31	9.18	9.32	9.31
40	8.52	8.94	8.92	8.50	8.50	8.29	9.11	9.29	9.35
60	8.61	9.00	8.99	8.38	8.55	8.31	9.18	9.30	9.35
80	8.64	9.00	9.00	8.44	8.56	8.21	9.34	9.39	9.30
100	8.68	9.12	9.01	8.41	8.55	8.24	9.33	9.38	9.30
120	8.73	9.10	9.03	8.48	8.49	8.32	9.39	9.44	9.33
140	8.70	9.12	9.07	8.42	8.53	8.35	9.30	9.41	9.30
160	8.76	9.17	9.07	8.51	8.53	8.31	9.43	9.35	9.27
180	8.77	9.27	9.08	8.55	8.51	8.41	9.40	9.39	9.26

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

ตารางที่ จ.27 ค่าสีเจละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	สี*																										
	Concentration of enzyme 200 U/mg																										
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0																				
	40°C			50°C			60°C			40°C			50°C			60°C											
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b						
20	84.36	+2.60	+22.30	89.43	+0.32	+16.98	84.13	+1.36	+20.18	80.98	+3.25	+22.01	88.84	+0.98	+18.58	86.44	+0.86	+18.70	74.86	+4.27	+24.31	80.45	+3.07	+21.81	87.56	+1.50	+17.53
ΔE	8.05			0.46			6.63			10.58			2.19			3.84			17.09			10.88			2.50		
100	84.18	+3.35	+22.51	82.33	+2.01	+19.96	79.81	+1.88	+32.66	88.89	+1.42	+16.91	83.40	+1.76	+18.30	82.06	+1.84	+16.81	69.90	+5.83	+27.62	78.42	+1.68	+26.95	83.04	+3.14	+19.92
ΔE	8.54			8.19			18.88			1.26			6.60			7.70			23.23			14.84			7.86		
180	71.48	+5.94	+28.56	75.22	+4.08	+20.22	74.17	+3.52	+16.37	81.60	+3.21	+20.17	83.96	+1.65	+17.50	87.86	+1.52	+16.89	65.32	+7.18	+29.82	71.25	+2.81	+20.93	78.75	+5.26	+19.38
ΔE	22.42			15.30			15.77			9.21			5.87			2.09			28.48			19.03			12.12		

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ.28 ค่าสีเจละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	สี*																										
	Concentration of enzyme 5,000 U/mg																										
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0																				
	40°C			50°C			60°C			40°C			50°C			60°C											
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b						
20	91.11	+0.46	+15.23	87.81	+1.80	+16.41	77.96	+2.19	+16.42	89.33	+1.75	+15.24	78.42	+4.66	+20.38	86.10	+1.58	+18.93	88.46	+1.76	+14.08	85.90	+2.44	+20.07	87.16	+1.78	+18.25
ΔE	2.00			2.27			11.80			1.90			12.56			4.38			3.07			5.47			3.26		
100	83.87	+2.73	+15.11	77.55	+2.18	+17.99	67.33	+4.15	+16.43	83.12	+1.67	+16.87	77.45	+2.98	+18.93	84.88	+2.44	+20.90	82.10	+3.56	+23.88	80.85	+2.16	+19.64	80.46	+3.16	+20.96
ΔE	6.38			12.29			22.61			6.63			12.66			6.71			10.92			9.45			10.51		
180	81.38	+2.96	+16.62	74.61	+3.47	+17.67	64.11	+3.59	+15.01	80.13	+3.97	+24.11	76.37	+4.38	+19.90	78.32	+3.04	+21.30	79.82	+3.26	+17.08	79.43	+4.04	+24.25	77.82	+2.47	+17.59
ΔE	8.63			15.36			25.77			12.61			14.22			12.52			10.22			13.25			12.03		

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

ตารางที่ จ.29 ค่าสีเจละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10,000 U/mg ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	สี*																										
	Concentration of enzyme 10,000U/mg																										
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0																				
	40°C			50°C			60°C			40°C			50°C			60°C											
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b						
20	82.01	+2.90	+19.81	86.14	+2.19	+14.42	82.31	+1.81	+21.95	84.29	+2.41	+16.01	88.61	+1.59	+11.26	80.73	+2.92	+21.88	81.82	+1.14	+10.36	88.90	+1.69	+15.27	90.05	+1.05	+17.46
ΔE	8.62			4.25			9.17			5.72			5.55			10.64			10.02			2.83			1.12		
100	86.24	+2.51	+16.41	84.58	+1.12	+17.01	74.81	+3.29	+19.12	78.80	+3.59	+18.14	79.17	+1.79	+13.42	84.73	+1.73	+18.60	82.48	+3.14	+15.84	79.77	+3.73	+19.51	82.58	+2.88	+21.70
ΔE	3.97			5.11			15.30			11.38			11.02			5.45			7.68			10.79			9.03		
180	83.83	+2.80	+14.58	66.71	+3.77	+16.27	71.45	+5.04	+20.68	77.77	+3.39	+18.15	79.70	+3.37	+18.48	79.26	+4.18	+24.76	78.03	+3.90	+16.01	77.86	+3.13	+21.18	78.32	+3.09	+17.03
ΔE	6.58			23.17			19.19			12.32			10.52			13.71			12.12			12.91			11.62		

* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ.30 ค่าสีเจละตินที่ได้จากการสกัดโดยใช้เอนไซม์ ที่เวลา อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ

Time (min)	สี*																										
	Non enzyme																										
	pH 8.0			pH 9.5			pH 11.0																				
	40°C			50°C			60°C																				
	L	a	b	L	a	b	L	a	b																		
20	83.44	+1.37	+19.50	84.37	+1.87	+17.83	77.00	+2.66	+19.14	82.10	+2.44	+21.72	87.05	+1.76	+17.68	92.49	+0.76	+9.44	87.33	+1.93	+15.81	87.50	+1.84	+18.23	87.41	+2.20	+17.24
ΔE	6.90			5.59			13.07			9.32			3.09			7.71			2.84			3.02			2.90		
100	88.10	+1.36	+19.33	84.72	+1.31	+18.49	74.39	+2.66	+18.95	79.42	+3.93	+23.30	82.63	+3.18	+19.06	90.76	+0.73	+13.00	85.73	+2.96	+19.51	84.17	+2.50	+17.56	83.82	+3.00	+20.61
ΔE	3.26			5.33			15.58			12.70			7.91			3.78			5.48			5.91			7.51		
180	81.13	+3.40	+20.30	78.36	+3.46	+19.55	73.39	+2.48	+13.65	76.17	+4.72	+21.71	71.73	+4.89	+20.11	84.44	+2.20	+18.10	83.53	+3.41	+17.14	81.24	+2.02	+16.42	81.14	+2.84	+19.68
ΔE	9.73			12.03			16.63			15.02			18.78			5.68			6.80			8.54			9.34		

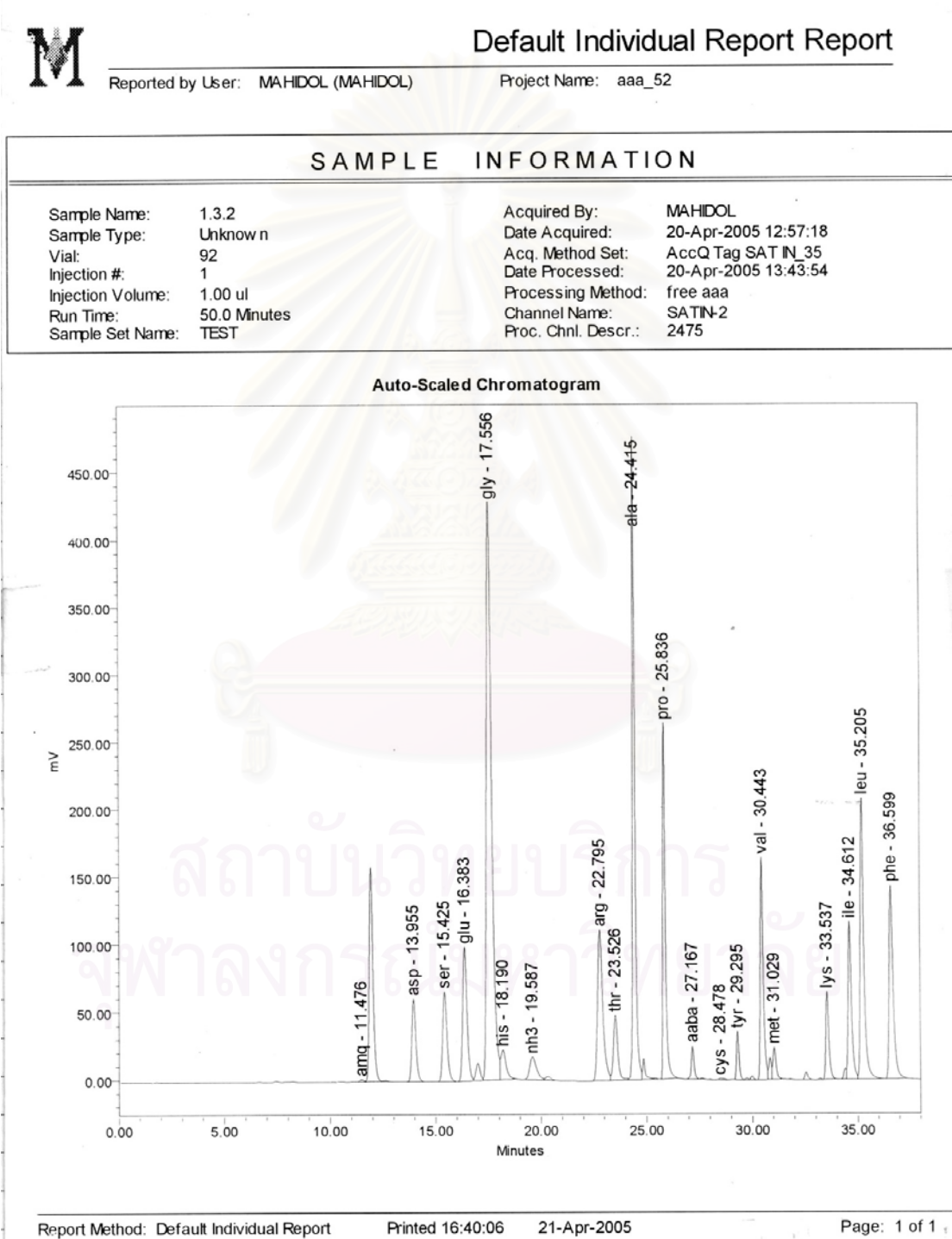
* ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

โครมาโตแกรมของกรดอะมิโน

รูปที่ จ.1 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในตัวอย่างหนึ่งเป็ยก โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ (ครั้งที่ 1)



รูปที่ จ.2 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในตัวอย่างหนึ่งเป็ยก โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ (ครั้งที่ 2)



Default Individual Report Report

Reported by User: MAHIDOL (MAHIDOL)

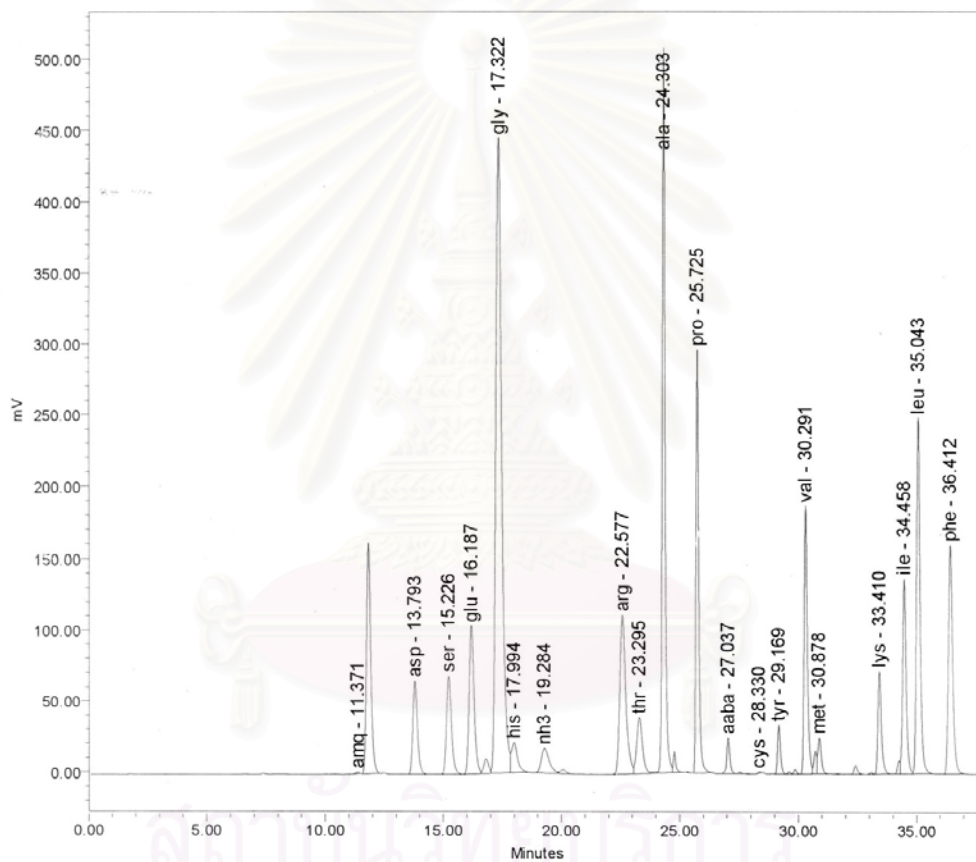
Project Name: aaa_52

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: 1.3.1
 Sample Type: Unknown
 Vial: 91
 Injection #: 1
 Injection Volume: 1.00 ul
 Run Time: 50.0 Minutes
 Sample Set Name: TEST

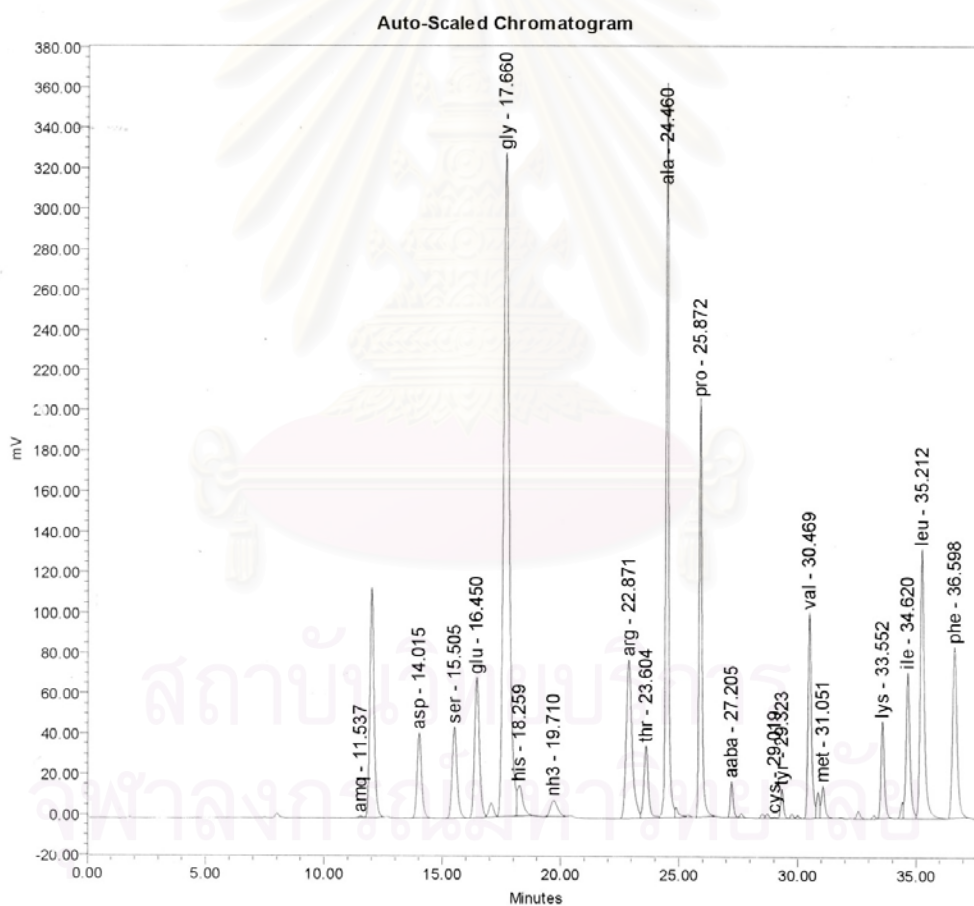
Acquired By: MAHIDOL
 Date Acquired: 20-Apr-2005 12:06:10
 Acq. Method Set: AccQ Tag SAT_IN_35
 Date Processed: 20-Apr-2005 13:29:35
 Processing Method: free aaa
 Channel Name: SATIN-2
 Proc. Chnl. Descr.: 2475

Auto-Scaled Chromatogram



รูปที่ ๓.3 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในตัวอย่างเจละดินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของ เอนไซม์เท่ากับ 5,289.375 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที และ pH 9.5 โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ (ครั้งที่ 1)

M		Default Individual Report Report	
Reported by User: MAHIDOL (MAHIDOL)		Project Name: aaa_52	
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	2.3.1	Acquired By:	MAHIDOL
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	19-Apr-2005 15:09:08
Vial:	94	Acq. Method Set:	AccQ Tag SAT IN_35
Injection #:	1	Date Processed:	19-Apr-2005 15:47:34
Injection Volume:	1.00 ul	Processing Method:	free aaa
Run Time:	50.0 Minutes	Channel Name:	SATIN-2
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	2475



รูปที่ ๑.4 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในตัวอย่างเจลละตินที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นของ เอนไซม์เท่ากับ 5,289.375 U/mg อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 180 นาที และ pH 9.5 โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ (ครั้งที่ 2)



Default Individual Report Report

Reported by User: MAHIDOL (MAHIDOL)

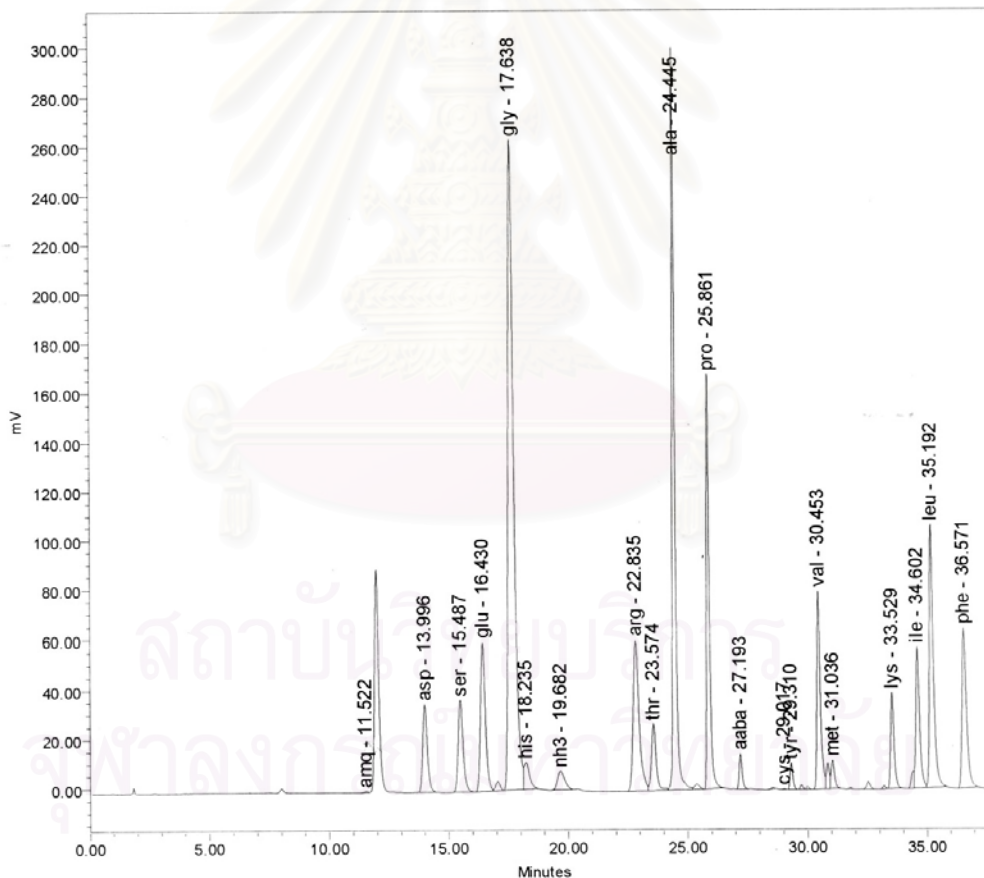
Project Name: aaa_52

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: 2.3.3
 Sample Type: Unknown
 Vial: 95
 Injection #: 1
 Injection Volume: 1.00 ul
 Run Time: 50.0 Minutes
 Sample Set Name:

Acquired By: MAHIDOL
 Date Acquired: 19-Apr-2005 16:00:10
 Acq. Method Set: AccQ Tag SAT IN_35
 Date Processed: 21-Apr-2005 16:43:40
 Processing Method: free aaa
 Channel Name: SATIN-2
 Proc. Chnl. Descr.: 2475

Auto-Scaled Chromatogram

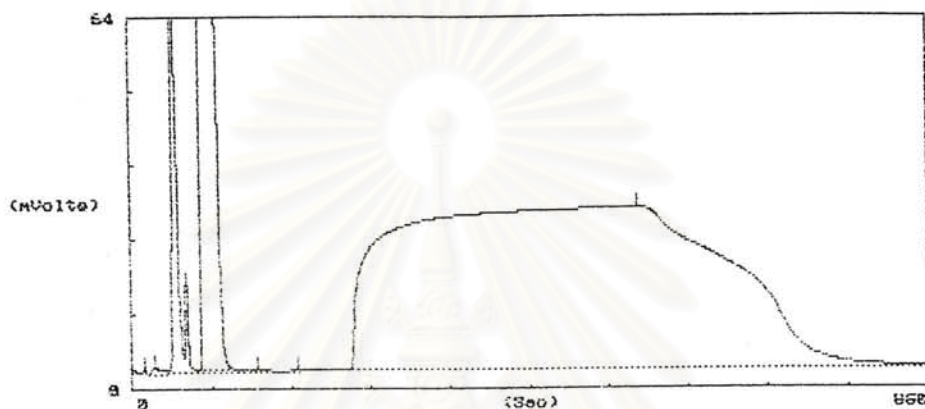


โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์โปรตีนในหนังเป็ดด้วย Elemental Analysis

รูปที่ ๓.5 โครมาโตแกรมของโปรตีนในตัวอย่างหนังเป็ด โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน

EAGER 200 Stripchart

Sample Ident. : 28 60KG Filename : OB
Analysed : 03-04-04 10:01:40 Printed : 03-04-2004 10:15:53



EAGER 200 Peak Integration Report

Instrument name : Instrument #1 Bline drift (µV): 682
Company Name : IBGE Operator Ident. : KK
Analysed : 03-04-04 10:01:40 Printed : 03-04-2004 10:15:54
Sample Ident. : 28 60KG Filename : OB
Sample Weight : 12.793 Calc.method: using 'Square to Linear fit'

No. (#)	Type (#)	Start (Sec)	End (Sec)	Ret Time (Sec)	Height (µV)	Area (µV*Sec)	Area % (%)	Name	
1	RS	11	18	14	445.7	1339	0.01		
2	FU	18	38	25	1014.7	11967	0.07		
3	TL	38	152	46	90102.5	454132	2.78	Nitrogen	
4	CR	55	61	58	12291.8	28715	0.18		
5	CR	70	123	77	460172.6	4673241	28.61	Carbon	
6	CR	126	142	134	172.0	1354	0.01		
7	RS	165	184	176	30.9	335	0.00	Hydrogen	
8	RS	191	848	542	27294.6	11164738	68.35	Sulphur	
							16335822	100.00	

EAGER 200 Unk Report

Instrument name : Instrument #1 Bline drift (µV): 682
Company Name : IBGE Operator Ident. : KK
Analysed : 03-04-04 10:01:40 Printed : 03-04-2004 10:15:54
Sample Ident. : 28 60KG Filename : OB
Sample Weight : 12.793 Calc.method: using 'Square to Linear fit'

Pk. (#)	Ret Time (Sec)	Area (µV*Sec)	Element % (%)	Area Ratio	Name
3	46	454132	2.54%	102905E+02	Nitrogen
5	77	4673241	10.32%	100000E+01	Carbon
7	176	335	3.47%	139375E+05	Hydrogen
8	542	11164738	89.91%	418572E+00	Sulphur

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปาริชาติ ลบแยม เกิดเมื่อวันที่ 27 พฤษภาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัด ระยอง สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในปีการศึกษา 2544 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย