

การสกัดและคุณสมบัติของเจลาตินหนังกบเสือ (*Rana tigerina*) จากการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วย  
Extraction and characterization of gelatin from Asian bullfrog (*Rana tigerina*) skin by ultrasound-assisted process



ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร  
คณะอุตสาหกรรมเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การสกัดและคุณสมบัติของเจลาตินหนังกบเสือ (*Rana tigerina*) จากการ  
ใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วย  
Extraction and characterization of gelatin from Asian bullfrog  
(*Rana tigerina*) skin by ultrasound-assisted process

จัดทำโดย

กิตติ	อินทองคุ้ม	รหัสนักศึกษา 58080009
ชนิษฐา	บุญพูน	รหัสนักศึกษา 58080012
เบญจวรรณ	นิลรัตนานนท์	รหัสนักศึกษา 58080043

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

(ดร. สุตตรา กาญจนประทุม)  
อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

...../...../.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การสกัดและคุณสมบัติของเจลาตินหนังกบเสื่อ ( <i>Rana tigerina</i> ) จากการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วย
ชื่อนักศึกษา	กิตติ อินทองคุ้ม รหัสนักศึกษา 58080009 ชนิษฐา บุญพูน รหัสนักศึกษา 58080012 เบญจวรรณ นิลรัตนานนท์ รหัสนักศึกษา 58080043
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สุพัตรา กาญจนประทุม

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสื่อ (*Rana tigerina*) ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยทำการทดลองใช้อัลตราซาวด์ที่ระยะเวลา (10, 20, 40 และ 60 นาที) และจังหวะการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ (เปิด 5 นาที/ปิด 25 นาที (5/25) และ เปิด 10 นาที/ปิด 50 นาที (10/50)) ต่างๆ เป็นกระบวนการช่วยสกัดเจลาตินหนังกบที่ได้นำมาวิเคราะห์ผลผลิตคิดเป็นของแข็งทั้งหมด (Total Solid Yield) ผลผลิตคิดเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Recovery) คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ความแข็งแรงเจล และรูปแบบโปรตีน เปรียบเทียบกับเจลาตินที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด (Control) พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดสามารถเพิ่มผลผลิตเจลาติน (Total Solid Yield และ Recovery) ตามการเพิ่มขึ้นของระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์ในทั้งสองจังหวะการเปิด/ปิดที่ทำการทดลอง (5/25 และ 10/50) โดย 5/25 ให้ค่า Total Solid Yield สูงที่สุด (58.23 %) ในขณะที่ 10/50 ให้ค่า Recovery สูงที่สุด (87.08%) จากผลการทดสอบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในตัวอย่างเจลาตินหนังกบที่ได้ พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดทำให้ปริมาณ ไฮดรอกซีโพรลีนในเจลาตินลดลง ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณของแข็งที่ไม่ใช่โปรตีนเจลาตินที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าสีและค่าความขุ่นของเจลาตินที่เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการใช้อัลตราซาวด์เพิ่มขึ้น ในทั้งสองจังหวะการเปิด/ปิดที่ 5/25 และ 10/50 จากการวิเคราะห์ความแข็งแรงเจลของเจลาตินหนังกบ พบว่าเจลาตินหนังกบจาก Control (431.42 กรัม) มีค่าสูงกว่าเจลาตินทางการค้าจากวัว (292.16 กรัม) และปลา (279.51 กรัม) โดยการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดส่งผลให้ค่าความแข็งแรงเจลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก Control แต่อย่างไรก็ตาม การใช้อัลตราซาวด์ที่สภาวะการเปิด/ปิด 10/50 ให้เจลาตินที่มีค่าความแข็งแรงเจลสูงกว่าเจลาตินทางการค้า ( $P < 0.05$ ) ในทุกระยะเวลาที่ทำการศึกษา ( $P < 0.05$ ) และให้เจลาตินที่มีค่าความแข็งแรงเจลเทียบเคียงได้กับ Control เมื่อใช้อัลตราซาวด์ที่ระยะเวลา 20 นาที (420.94 กรัม) ( $P > 0.05$ ) จากผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของเจลาตินหนังกบโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ส่งผลให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนเจลาติน เกิดโปรตีนสายสั้นที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กลง เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในทั้งสองจังหวะการเปิด/ปิดที่ทำการศึกษาดังนั้นอัลตราซาวด์ถือได้ว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นกระบวนการช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสื่อและแหล่งโปรตีนเจลาตินอื่นๆ ที่ใกล้เคียง และควรทำการศึกษาสภาวะการใช้อัลตราซาวด์ที่เหมาะสมกับวัตถุดิบแต่ละชนิด เพื่อให้ได้เจลาตินที่มีผลผลิตสูงและมีคุณภาพที่ดี

คำสำคัญ: กบเสื่อ (*Rana tigerina*) หนังกบ เจลาติน อัลตราซาวด์ กระบวนการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title Extraction and characterization of gelatin from Asian bullfrog  
(*Rana tigerina*) skin by ultrasound-assisted process

Student name Kitti Inthongkhum Student ID 58080009  
Khanittha Boonpoon Student ID 58080012  
Benjhawan Ninrattananon Student ID 58080043

Program Bachelor of Science in Industrial Food Science and Technology  
Year 2019  
Advisor Dr.Supatra Karnjanapratum

## ABSTRACT

The present study aimed to study the process on characteristics of gelatins from Asian bull frog (*Rana tigerina*) skin, which were extracted at 55 °C for 12 hours. Different ultrasound treatment times (10, 20, 40 and 60 min) and periods (5 min running/25 min Stop (5/25)) and (10 min running/50 min Stop (10/50)) were conducted as assisted process. The gelatin samples were subjected to analyse on total solid yield, hydroxyproline recovery, physiochemical characteristics gel strength and protein pattern, in comparison with those from without ultrasound-assisted process (control). The results showed that ultrasound-assisted process could yield the higher total solid yield and hydroxyproline recovery as ultrasound treatment time increased for both periods tested. The highest total solid yield (58.23%) and hydroxyproline recovery (87.08%) were obtained from 5/25 and 10/50 periods, respectively, at the highest ultrasound treatment time used. The increase of ultrasound treatment time could decrease hydroxyproline content as well as increased, the content of non gelatin protein solid of resulting gelatin. These results were in accordance with the increase of color change and turbidity of gelatin as ultrasound treatment time increased, in both periods tested. For gel strength analysis, the control sample (431.42g) had higher gel strength than commercial gelatin from bovine (292.16g) and fish (279.51g). Ultrasound-assisted process decreased the gel strength of gelatin, compared with Control sample. Nevertheless, 10/50 period provided the gelatin with higher gel strength than commercial one ( $P < 0.05$ ) for every ultrasound treatment time tested. Moreover, the gelatin with comparable gel strength to that from Control (420.94g) could be obtained from 20 min of ultrasound treatment time with 10/50 period. Based on protein pattern by SDS-PAGE, ultrasound could cause the degradation of gelatin peptides and rendered the generation of small peptide chain as ultrasound treatment time increased, for both periods used. Therefore, ultrasound could effectively be used as assisted process for gelatin extraction from frog skin and other related gelatin sources, in which ultrasound condition should be optimized to obtain the gelatin with high yield and good qualities.

Keywords: Asian bullfrog (*Rana tigerina*), Frog skin, Gelatin, Ultrasound, Extraction process

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาปัญหาพิเศษในหัวข้อ “การสกัดและคุณสมบัติของเจลาตินหนังกบเสือ (*Rana tigerina*) จากการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วย” ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ ดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีจาก ดร. สุพัตรา กาญจนประทุม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในการแนะนำ ให้ข้อเสนอแนะ ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัยตั้งแต่ขั้นตอนการวางแผน และการปฏิบัติงานจริง คอยติดตามดูการทำงาน และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน ตลอดจนการจัดหาวัสดุอุปกรณ์สำหรับทำงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. สุพีรยา อาษา ที่ท่านได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบงานวิจัย และคอยให้คำแนะนำ และให้การสนับสนุนอย่างดีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิทธิพงศ์ นลินานนท์ ที่ท่านให้การสนับสนุนในส่วนของอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย รวมถึงพี่ๆ นักศึกษาปริญญาโทที่สละเวลาช่วยเหลือให้ข้อมูลและคำแนะนำต่างๆ ที่ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอบคุณเพื่อนๆ ที่ให้การสนับสนุน คอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ รวมทั้งคอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา จนกระทั่งสำเร็จการศึกษา สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอมอบประโยชน์อันเกิดจากงานวิจัยฉบับนี้แก่ครูบาอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน หากงานวิจัยฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

กิตติ อินทองคัม

ชนิษฐา บุญพูน

เบญจวรรณ นิลรัตนานนท์

14 พฤษภาคม 2562

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 คอลลาเจน	3
2.2 เจลาติน	4
2.3 กระบวนการผลิตเจลาติน	5
2.4 คุณสมบัติของเจลาติน	7
2.5 มาตรฐานในการตรวจสอบคุณสมบัติของเจลาติน	10
2.6 หลักการเทคโนโลยีอัลตราซาวด์	11
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	17
3.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี	17
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	18
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	18
3.4 วิเคราะห์ผล	20
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	21
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	22
4.1 ผลผลิตเจลาตินคิดเป็นปริมาณของแข็ง	22
4.2 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน	23
4.3 ค่าสีและค่าความขุ่น	25
4.4 ความแข็งแรงเจล	27
4.5 รูปแบบของโปรตีนเจลาติน	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	31
5.1 สรุปผลการวิจัย	31
5.2 ข้อเสนอแนะ	31
บรรณานุกรม	32
ภาคผนวก	37
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี	38
ภาคผนวก ข วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของเจลาติน	39
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรต	40
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน	41
ภาคผนวก จ การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของเจลาตินจากหนังกบเสือ	43
ประวัติผู้เขียน	46



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สภาวะการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดเจลาติน	20
4.1 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของเจลาตินที่สกัดได้จากหนังกบเสือ ( <i>R. tigrina</i> ) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ	25
4.2 ค่าสีและค่าความขุ่นของของเจลาตินจากหนังกบเสือ ( <i>R. tigrina</i> ) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ	27



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของคอลลาเจนที่เกิดจากการรวมตัวของกรดอะมิโน	3
2.2 โครงสร้างของคอลลาเจนไฮโดรไลซิสด้วยความร้อนไปเป็นเจลาติน	4
2.3 กบเสือ ( <i>R. tigrina</i> )	5
2.4 การจับตัวกันของโมเลกุลเจลาตินเกิดเป็นภาพ 3 มิติ	7
2.5 รูปแบบของโปรตีนเจลาตินที่ได้จากการวิเคราะห์ SDS- PAGE ที่สกัดจาก เท้าเป็ดโดยการปรับสภาพที่แตกต่างกัน จากการใช้สารละลายกรด ต่าง และเอนไซม์	8
2.6 คลื่นความถี่ของอัลตราซาวด์ในช่วงต่าง ๆ	12
2.7 อ่างอัลตราซาวด์	13
2.8 ลักษณะของฮอร์นชนิดต่างๆ และระบบอัลตราซาวด์แบบโพรบ	13
2.9 การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์	14
2.10 เครื่องอัลตราซาวด์และลักษณะของคลื่นอัลตราซาวด์	15
4.1 ผลผลิตเจลาตินคิดเป็นปริมาณของแข็งที่สกัดได้จากหนังกบเสือ ( <i>R. tigrina</i> ) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ	23
4.2 ผลผลิตคิดเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่สกัดได้จากหนังกบเสือ ( <i>R. tigrina</i> ) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ	24
4.3 ความแข็งแรงของเจลเจลาตินจากหนังกบเสือ ( <i>R. tigrina</i> ) โดยใช้อัลตราซาวด์ ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ	28
4.4 รูปแบบโปรตีนของเจลาตินจากหนังกบเสือ ( <i>R. tigrina</i> ) โดยใช้อัลตราซาวด์ ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ	30

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาพิเศษ

ในปัจจุบันมีการนำเจลาตินมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมภาพถ่าย ซึ่งทำให้ความต้องการของเจลาตินเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตเจลาตินจากแหล่งโปรตีนต่างๆ เช่น กระดูก ผิวหนังของสัตว์ต่างๆ เช่น ปลา เป็ด ไก่ กบ และวัว ที่เหลือจากกระบวนการผลิตหลัก เพื่อเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบให้สูงขึ้น และในปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงกบเป็นจำนวนมากในหลายๆ ประเทศ เนื่องจากสามารถสร้างผลกำไร และเลี้ยงในปริมาณมากในพื้นที่ที่จำกัดได้ซึ่งใช้ปริมาณน้ำในการเลี้ยงน้อย โดยกบที่นิยมนำมาเลี้ยงมีหลายสายพันธุ์ เช่น American Bullfrog, (*Lithobates catesbeianus*) และ Indian tiger frog, (*Hoplobatrachus tigrinus*) (Daszak และคณะ, 2006) และบางสายพันธุ์ยังสามารถนำมาใช้ในการผลิตยาทางการแพทย์ได้อีกด้วย (Oduntan และคณะ, 2012) ซึ่งในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงกบเลี้ยงสายพันธุ์ Asian Bullfrog จำนวนมาก เพื่อการบริโภคภายในประเทศ หรือส่งออกไปยังต่างประเทศ (Pariyanonth และคณะ, 1994) การเพาะเลี้ยงกบแพร่กระจายไปทั่วประเทศตามความต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น ฮองกง สิงคโปร์ และไต้หวัน (Wongtavatchai และคณะ, 2003) ซึ่งในกระบวนการตัดแต่ง (Cutting process) ของกบเสียมมีส่วนที่เหลือทิ้ง (Waste) ปริมาณมากประมาณ 45% ของกบทั้งตัว และยังไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เต็มที่ เช่น หนังกบที่นำมาผลิตเป็นหนังกบทอดกรอบสำหรับการบริโภคภายในประเทศ (Karnjanapratum และคณะ, 2017) ซึ่งได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อนำหนังกบมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากขึ้น เช่น การนำหนังกบมาสกัดเจลาตินเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ต่อไป ซึ่งพบว่าเจลาตินที่สกัดได้มีคุณภาพและความแข็งแรงของเจลสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเจลาตินที่สกัดจากหนังวัว แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการสกัดและผลผลิตเจลาตินที่ได้จากหนังกบยังใช้เวลาในการผลิตนาน 12 ชั่วโมง และให้ผลผลิตต่ำ (12%) (Karnjanapratum และคณะ, 2017)

มีงานวิจัยหลายชิ้นได้นำอัลตราซาวด์เข้ามาช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินจากแหล่งโปรตีนคอลลาเจนต่างๆ พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ในกระบวนการสกัดเจลาตินสามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการการสกัดได้และให้ผลผลิตสูงขึ้น (Ahmad และคณะ, 2018) โดยอัลตราซาวด์เป็นคลื่นที่มีความถี่อยู่ในช่วง 20kHz ถึง 100MHz เป็นพลังงานเชิงกลซึ่งทำให้เกิดการสั่นของเนื้อเยื่อเซลล์วัตถุดิบที่นำมาสกัดและสามารถลดขนาดและความแข็งแรงของโครงสร้างของวัตถุดิบทำให้การสกัดเป็นไปได้ดีขึ้น (Ince และคณะ, 2014; Huang และคณะ, 2017) ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการประยุกต์ใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินจากหนังกบเพื่อลดระยะเวลาในการสกัดและเพิ่มผลผลิตของเจลาตินให้ดียิ่งขึ้น พร้อมทั้งทำการศึกษาคุณลักษณะของเจลาตินหนังกบที่ได้ควบคู่ไปด้วย

### 1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาผลของการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือ (*Rana tigrina*) ที่มีต่อผลผลิต และคุณลักษณะของเจลาตินที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ทราบสถานะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้อัลตราซาวด์ในการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือ
- 1.3.2 เพิ่มมูลค่าของหนังกบที่ได้จากกระบวนการตัดแต่งเนื้อกบ
- 1.3.3 สามารถวางแผนการทำงานอย่างเป็นระบบ และใช้เครื่องมือต่างๆ สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพ และผลผลิตของเจลาตินได้อย่างถูกต้อง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

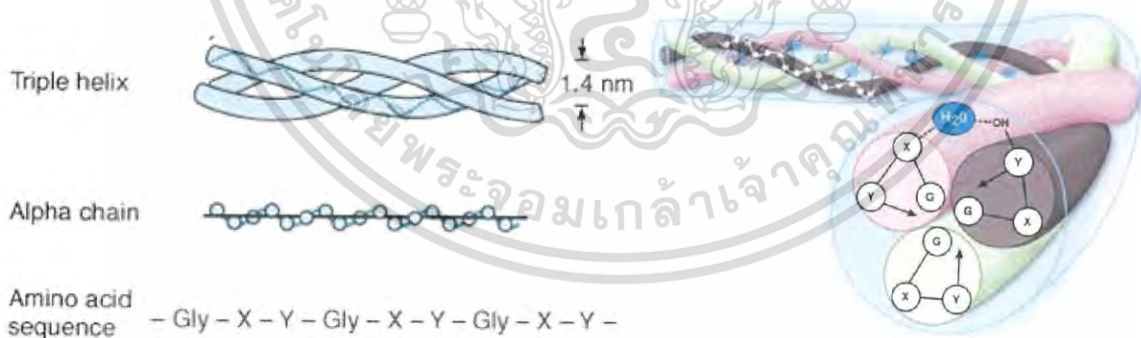
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 คอลลาเจน

คอลลาเจน เป็นโปรตีนธรรมชาติที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ในสัตว์และเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 30% ของโปรตีนทั้งหมด (Singh และคณะ, 2011) มักพบโปรตีนชนิดนี้ได้ที่ ผิวหนัง เอ็น กระดูก และกระดูกอ่อนของสัตว์ (Wasswa และคณะ, 2007) คอลลาเจนจะไม่ละลายในน้ำเย็น ต่างอ่อน และกรดอ่อน แต่จะละลายในน้ำร้อน และจะเกิดการพองตัวเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดหรือด่างเพิ่มมากขึ้น โดยโปรตีนคอลลาเจนจะเกิดการเสียสภาพ (Denaturation) จากการใช้อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการสลายตัวของคอลลาเจนเปลี่ยนเป็นเจลาติน (ฐิตินันท์ และคณะ, 2554)

##### 2.1.1 โครงสร้างคอลลาเจน

คอลลาเจนมีลักษณะเป็นเส้นใยเมื่ออยู่ในรูปของคอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen fibers) จะทำให้เซลล์ต่างๆ คงรูปร่างได้ คอลลาเจนหรือโทรโปคอลลาเจน (Tropocollagen) เกิดจากสายโพลีเปปไทด์สามสายพันกันเป็นเกลียวซึ่งแต่ละสายเรียกว่า สายโซ่แอลฟา ( $\alpha$ -Chain) สายโซ่แอลฟาทั้งสามสายจะเกิดเป็นโครงสร้างแบบทริเปิลเฮลิค (Triple helical) สายของโพลีเปปไทด์จะวนเป็นเกลียวไปทางซ้าย (Left-hand helix) ภายในสายโพลีเปปไทด์แต่ละสายเกิดจากการรวมกันของกรดอะมิโน  $(G-X-Y)_n$  โดย G X มักพบใน โกลซีน (Glycine) โพรลีน (Proline) และ Y ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline ; Hyp) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายโพลีเปปไทด์ หลังจากนั้นสายโพลีเปปไทด์ทั้งสามสายจะพันรอบกันเองเป็นเกลียวขวา (Right-hand helix) (Singh และคณะ, 2011)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของคอลลาเจนที่เกิดจากการรวมตัวของกรดอะมิโน  
ที่มา: พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา (ม.ป.ป.)

##### 2.1.2 ชนิดคอลลาเจน

คอลลาเจนสามารถแบ่งเป็น 29 ชนิด โดยแบ่งตามลำดับของกรดอะมิโน มวลโมเลกุลส่วนประกอบของหน่วยย่อย (subunit) ความยาวของสายเฮลิค คุณสมบัติ และขนาดของส่วนที่ไม่เป็นเฮลิค (Non-helix portion) (Zou และคณะ, 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. คอลลาเจน Type I ส่วนใหญ่พบในสัตว์ชั้นสูง บริเวณหนัง เอ็น และกระดูก ประกอบด้วย 3 สาย ได้แก่ สาย  $\alpha_1(I)$  จำนวน 2 สาย และ  $\alpha_2(I)$  จำนวน 1 สาย คอลลาเจนชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีน ประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด และส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่บิดเป็นเกลียวสั้นที่ประกอบด้วยไทโรซีน และฮิสติดีน

2. คอลลาเจน Type II ส่วนใหญ่พบในกระดูกอ่อน ประกอบด้วยสาย  $\alpha_1(II)$  จำนวน 3 สาย มีลักษณะคล้ายสาย  $\alpha_1(I)$  คอลลาเจนชนิดนี้มีปริมาณไฮดรอกซีไลซีนสูงกว่า Type I ถึง 3 เท่า

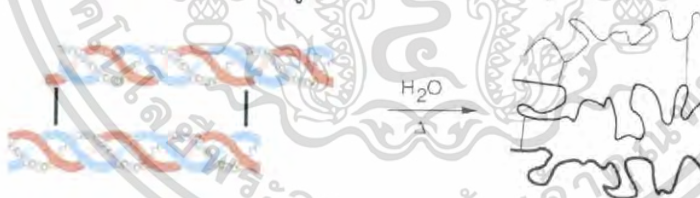
3. คอลลาเจน Type III พบได้ปริมาณน้อย (ประมาณ 10%) มักพบในเส้นเลือด และมีการจับกับคอลลาเจน Type I จึงพบ Type III ปนกับคอลลาเจน Type I หลังการสกัดคอลลาเจน (Piez, 1985)

4. คอลลาเจน Type IV เป็นคอลลาเจนที่มีลักษณะความจำเพาะ พบได้เฉพาะบริเวณเส้นใยฝอยในเยื่อแผ่นบางๆ บริเวณนอกเซลล์

สำหรับคอลลาเจนชนิดอื่นๆจะพบในปริมาณที่น้อยมากและมีการเชื่อมโยงกับโครงสร้างทางชีววิทยาที่จำเพาะ ในการศึกษาส่วนใหญ่นิยมศึกษาคอลลาเจน Type I เนื่องจากมีปริมาณมาก และมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะทางการแพทย์

## 2.2 เจลาติน

เจลาติน (Gelatin) เป็นโปรตีนที่ได้จากการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) คอลลาเจน โดยเกิดจากการเสียดสภาพของคอลลาเจนเนื่องจากความร้อน (Ahmad และคณะ, 2017) เจลาตินมีคุณสมบัติทนต่อความร้อนและทนต่อสภาวะกรด สามารถแบ่งได้ 2 ชนิดคือ Type A เป็นเจลาตินที่ผ่านการปรับด้วยกรด และ type B เป็นเจลาตินที่ผ่านการปรับด้วยด่าง (Benjakul และคณะ, 2009) ในปัจจุบันมีการนำเจลาตินมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นสารปรับแต่งเนื้ออาหาร สารเพิ่มความคงตัวในไอศกรีม สารเพิ่มความหนืด รวมทั้งเจลเคลือบอาหารหรือผักผลไม้ที่ต้องการให้มีความมันวาว รวมถึงอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง และฟิล์มถ่ายรูป (Monsur และคณะ, 2014)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของคอลลาเจนไฮโดรไลซิสด้วยความร้อนไปเป็นเจลาติน  
ที่มา : สีนินาถ (2555)

### 2.2.1 เจลาตินจากหนังกบ

เจลาติน เป็นกลุ่มเส้นใยโปรตีนที่ได้จากการเสียดสภาพทางธรรมชาติของคอลลาเจน โดยความร้อน ซึ่งนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมทั้งอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมอื่นๆ (Regenstein และ Zhou, 2007) โดยปกติแล้วเจลาตินสามารถสกัดได้จาก หนัง และกระดูกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จนกระทั่งเกิดมีการระบาดของโรคควัวบ้า (BSE; mad cow disease) ทำให้ผู้บริโภคหลีกเลี่ยงการบริโภคเจลาตินจากวัว (Abedinia และคณะ, 2017) จึงทำให้เจลาตินจากปลาเป็นที่สนใจมากขึ้นเนื่องจากมีความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตาม เจลาตินจากปลามีความแข็งแรงเจลที่ต่ำ ทำให้มีประสิทธิภาพในการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ค่อนข้างต่ำ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Petcharat และ Benjakul, 2017) จึงมีการหาแหล่งเจลาตินทางเลือกอื่นๆ เพื่อให้ได้เจลาตินที่มีคุณภาพ และให้ผลผลิตที่สูง ซึ่งพบว่า กบเสือ (*R. tigerina*) มีคุณสมบัติของคอลลาเจนเฉพาะตัวในทั้งทางฟิสิกส์เคมี (Purna และ Babu, 2001) คอลลาเจนที่ได้จากหนังกบเสือ (*R. tigerina*) ให้ผลผลิต (19.59%) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่ได้จากปลาน้ำจืด ดังนั้นกบเสือ (*R. tigerina*) จึงสามารถเป็นแหล่งเจลาตินทางเลือกใหม่ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนเจลาตินจากสัตว์บกได้ คุณสมบัติของเจลาตินจากหนังกบเสือจะถูกสกัดที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งเจลาตินที่สกัดโดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะได้เจลาตินที่มีความแข็งแรงเจลาตินมากที่สุด ( $P < 0.05$ ) ซึ่งมีค่าเทียบได้กับเจลาตินจากวัวที่มีขายทั่วไปในท้องตลาด เจลาตินที่สกัดได้พบแถบโปรตีนของสาย  $\alpha$  และ  $\beta$  ที่ชัดเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสายเปปไทด์ที่พบในเจลาติน จุดการเกิดเจลและจุดหลอมเหลวของเจลาติน จากหนังกบอยู่ในช่วง 23.47-24.87 องศาเซลเซียส และ 33.22-34.66 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม การสกัดเจลาตินด้วยวิธีแบบดั้งเดิมยังคงให้ปริมาณผลผลิตเจลาตินต่ำ 12% (Karnjanapratum และคณะ, 20017) จึงต้องมีการพัฒนากระบวนการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือเพื่อให้ได้คุณภาพของเจลาตินที่ดีและมีปริมาณผลผลิตที่สูงขึ้น



ภาพที่ 2.3 กบเสือ (*R. tigerina*)

ที่มา: <http://halalinthailand.com>

## 2.3 กระบวนการผลิตเจลาติน

กระบวนการผลิตเจลาตินสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การปรับสภาพวัตถุดิบ การสกัด และการทำแห้งเจลาติน กระบวนการทั้งหมดมีผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของเจลาตินที่ได้รับ กระบวนการเหล่านี้ต้องทำการปรับให้เหมาะสมกับแหล่งวัตถุดิบที่แตกต่างกัน

### 2.3.1 การปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้น (Pretreatment of raw material)

#### 2.3.1.1 การปรับสภาพด้วยสารละลายด่าง (Alkaline pretreatment)

ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้นก่อนการสกัดเจลาตินจำเป็นจะต้องกำจัดส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนคอลลาเจน และส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้างของโปรตีน เช่น Mucopolysaccharides และ Sulfur-containing ของวัตถุดิบ โดยการใช้สารละลายด่าง เช่น  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NaOH}$  ซึ่งวัตถุดิบที่ปรับสภาพด้วยด่างจะ เรียกว่า เจลาตินชนิดบี (type B gelatin) มีค่าพีเอชประมาณ 5.0-7.4 และจุดไอโซอิเล็กทริกประมาณ 4.7-5.3 (Abedinia และคณะ, 2017) จะทำให้เกิดการแตกหักของพันธะเปปไทด์ในคอลลาเจนจึงช่วยเพิ่มการปลดปล่อยโครงสร้างของคอลลาเจนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน (Monsur และคณะ, 2014) นอกจากนี้กระบวนการใช้สารละลายด่างยังช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคอลลาเจน (Regenstein และ Zhou, 2007)

### 2.3.1.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด (Acid pretreatment)

สำหรับการผลิตเจลาตินจะใช้สารละลายกรดอ่อน เช่น กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) จะใช้มากกับวัตถุดิบที่เป็น หนังหมู หนังปลา และกระดูกบางชนิด เนื่องจากมีความเข้มข้นต่ำทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนเกิดการพองตัว สามารถหยุดการทำงานของพันธะโควาเลนต์ทั้งภายในและภายนอกโมเลกุลของคอลลาเจน ซึ่งทำให้สายโพลีเปปไทด์สั้นลง ส่งผลต่อผลผลิตของเจลาตินที่ได้สูงขึ้น (Monsur และคณะ, 2014) และการใช้กรดในการปรับสภาพวัตถุดิบจะเรียกว่า เจลาตินชนิดเอ (type A gelatin) มีค่าพีเอชประมาณ 3.8-6.0 และจุดไอโซอิเล็กทริกประมาณ 6-8 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการนำเอนไซม์มาใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้นในสภาวะกรด (Wasswa และคณะ, 2007) เนื่องจากเอนไซม์มีส่วนช่วยในการย่อยโปรตีนได้ดีในสภาวะที่ค่าพีเอชต่ำ (pH 2-3) และมีความสามารถในการละลายเส้นใยคอลลาเจนโดยจะเกิดการพองตัว ทำให้ส่วนที่เป็นที่โพลีเปปไทด์และสายทริเปิลเฮลิกซ์ (triple helix) ของโครงสร้างคอลลาเจนถูกตัดออกและทำให้สายโพลีเปปไทด์สั้นลงทำให้สามารถสกัดเจลาตินได้ง่ายขึ้นและให้ผลผลิตที่สูงขึ้น (Abedinia และคณะ, 2017)

### 2.3.2 การสกัดเจลาติน (Extraction)

ในการสกัดเจลาตินเป็นการเปลี่ยนคอลลาเจนที่ไม่ละลายน้ำให้สามารถละลายน้ำได้เรียกว่า เจลาติน (Benjakul และคณะ, 2009) ดังนั้นจะใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเจลาตินจะทำให้ปริมาณผลผลิตของเจลาตินที่ได้สูงขึ้น การใช้อุณหภูมิสูงจะทำให้ได้เจลาตินที่มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลงด้วย เนื่องมาจากความร้อนมีผลในการทำลายพันธะภายในโครงสร้างของเจลาติน ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาติน เช่น ความแข็งแรงเจล และความหนืดจะลดลง (สินินาถ, 2555) อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดมีความสำคัญต่อคุณลักษณะของเจลาตินที่ได้ (Jongjareonrak และคณะ, 2006) จากการสกัดส่วนใหญ่พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิสูงๆ ทำให้ได้ผลผลิตเจลาตินสูง แต่คุณสมบัติทางกายภาพไม่ดี รวมทั้งการปรับสภาพวัตถุดิบที่นานเกินไปก่อนการสกัดที่ใช้เวลานานต่อเนื่องกันจะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักและสูญเสียคุณสมบัติทางกายภาพ นอกจากนี้จะทำให้เจลาตินที่ได้มีปริมาณสูงขึ้น แต่จะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนในปริมาณต่ำ (Kittiphattanabawon และคณะ, 2010)

### 2.3.3 การทำให้บริสุทธิ์และการทำแห้งเจลาติน (Purification and drying)

การทำให้เจลาตินบริสุทธิ์เบื้องต้นโดยการกรองสารละลายเจลาตินด้วยตะแกรงตาถี่ 2 ชั้น (double layer gauze) หรืออาจใช้ผ้าขาวบาง 4 ชั้น (4 layers cheese cloth) รวมทั้งวิธีการหมუნเหวียง ซึ่งจะทำให้การกรองมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Monsur และคณะ, 2014) หลังจากการทำให้บริสุทธิ์จะนำสารละลายเจลาตินมาทำให้เข้มข้น โดยการระเหยน้ำด้วยเครื่องระเหยน้ำ (Evaporator) ซึ่งจะระเหยน้ำออกประมาณร้อยละ 50-75 ใช้อุณหภูมิประมาณ 50-70 องศาเซลเซียส เนื่องจากสารละลายเจลาตินมีความไวต่ออุณหภูมิ ดังนั้นควรใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะความร้อนจะทำให้พันธะเปปไทด์เกิดการย่อยสลายจึงมีผลทำให้ค่าความแข็งแรงของเจลต่ำ หลังจากระเหยน้ำออกแล้วก็นำเจลาตินที่ได้ไปทำแห้ง ซึ่งเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ได้แก่ เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) เจลาตินที่ได้จะมีคุณภาพที่ดี เนื่องจากโครงสร้างไม่ถูกทำลายจากความร้อน แต่มีข้อเสียเนื่องจากราคาแพงจึงมีการใช้เครื่องมือชนิดอื่นแทน ได้แก่ เครื่องทำแห้งแบบอุโมงค์ (Drying tunnels) เครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้ง (Drum drying) เครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum oven) และตู้อบไฟฟ้าแบบควบคุมอุณหภูมิและเวลา (ฉัญลักษณ์, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

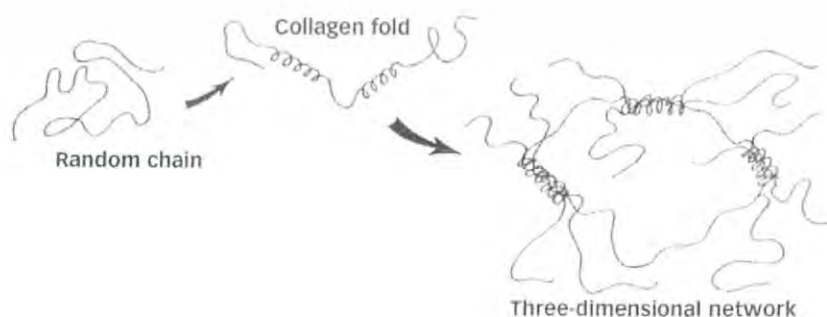
## 2.4 คุณสมบัติของเจลาติน

### 2.4.1 การละลาย (Solubility)

เจลาตินผงจะละลายได้ในน้ำอุ่นหรือน้ำร้อน จะต้องคนตลอดเวลาจนกระทั่งได้เป็นสารละลายเนื้อเดียว เจลาตินจะเกิดการดูดซับน้ำและพองตัว อย่างไรก็ตาม เจลาตินบางส่วนที่เกิดจากการเสียดสภาพได้ง่ายจะละลายในน้ำเย็นเพื่อให้สารละลายมีความเสถียร เจลาตินสามารถละลายได้อย่างอิสระในช่วงพีเอชต่างๆ Benjakul และคณะ (2009) ความสามารถในการละลายของเจลาตินอยู่ในช่วงพีเอช 1-10 ซึ่งมีค่าพีเอชช่วงกว้างเนื่องจากการละลายเป็นสิ่งที่สำคัญของโปรตีนที่มีในอาหาร

### 2.4.2 ความแข็งแรงเจล (Gel strength)

ความแข็งแรงเจล (Gel strength) เป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่สุดของเจลาติน การวัดจะวัดการต้านทานต่อแรงกด โดยนิยมนวัดเป็นค่าบลูม (Bloom strength) ด้วยเครื่อง Bloom Gelometer ค่านี้เป็นแรงในหน่วยกรัม ที่ใช้การกดหัววัดลงไปบนเจลความเข้มข้นร้อยละ 6.67 เจลที่ใช้ต้องผ่านการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (karnjanapartum และคณะ, 2017) เจลาตินที่จำหน่ายทางการค้ามีความแข็งแรงเจลอยู่ในช่วง 50-300 กรัม เจลาตินที่มีค่าความแข็งแรงเจล 200-300 กรัม ถือว่ามีค่าความแข็งแรงเจลสูง ส่วนเจลาตินที่มีค่าความแข็งแรงเจลที่ 100-200 กรัม ถือว่ามีค่าความแข็งแรงเจลปานกลาง และที่มีค่าความแข็งแรงเจล 50-100 กรัม ถือว่ามีค่าความแข็งแรงเจลต่ำ เจลาตินที่มีความแข็งแรงเจลสูงจะมีจุดหลอมเหลวและจุดเกิดเจลสูง ใช้ระยะเวลาการเกิดเจลสั้น รวมทั้งมักมีสีอ่อน มีกลิ่นและรสชาติดีกว่าชนิดที่มีค่าบลูมต่ำ ความสามารถในการเกิดเจลสูงยังหมายถึงปริมาณที่น้อยลงเพื่อให้เจลมีความแข็งแรงเท่ากัน การทดสอบความแข็งแรงของเจลนี้จะต้องทำตามวิธีที่ใช้ทดสอบอย่างเคร่งครัด เนื่องจากความแข็งแรงเจลขึ้นกับความเข้มข้นของเจลอย่างมาก ดังนั้นจึงต้องชั่งเจลาตินและตวงให้ถูกต้อง ภาชนะบรรจุตัวอย่างจะต้องมีรูปร่างตามที่กำหนด การละลายเจลาตินต้องทำที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที การสูญเสียน้ำระหว่างการให้ความร้อนนี้อาจทำให้ความเข้มข้นของเจลาตินเพิ่มขึ้น และส่งผลต่อค่าความแข็งแรงเจล ดังนั้นจึงต้องระวังไม่ให้เกิดฟองระหว่างการเตรียมตัวอย่าง การเกิดเจลจะต้องทำตามสภาวะมาตรฐาน เนื่องจากกระบวนการการเกิดเจลเกิดขึ้นอย่างช้าๆ การทำให้เย็นอย่างรวดเร็วจะทำให้ค่าบลูมลดลงประมาณร้อยละ 10 ความแข็งแรงเจลจะเพิ่มขึ้นระหว่างการบ่มจนถึง 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นความแข็งแรงเจลจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มจึงส่งผลต่อค่าที่วิเคราะห์อย่างมาก ดังนั้นจึงนิยมทิ้งให้เจลแข็งตัวในอ่างน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส การเปียงเบนของอุณหภูมิไม่ควรเกิน 1 องศาเซลเซียส

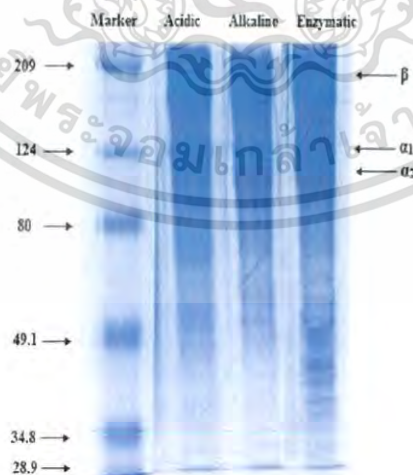


ภาพที่ 2.4 การจับตัวกันของโมเลกุลเจลาตินเกิดเป็นภาพ 3 มิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานที่ควรระวังเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ที่มา: ธัญลักษณ์ (2556)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปเจลาตินที่มีมวลโมเลกุลต่ำจะให้ความแข็งแรงเจลและความหนืดที่ต่ำ อย่างไรก็ตาม สายแอลฟา ( $\alpha$ -chain) ของคอลลาเจนซึ่งมีมวลโมเลกุล 100 กิโลดาลตัน และให้ความแข็งแรงเจล 364 กรัม จะเป็นองค์ประกอบที่สัมพันธ์กับความแข็งแรงของเจลที่มากที่สุด ในขณะที่โมเลกุลขนาดใหญ่กว่า คือ สายเบต้า ( $\beta$ -chain) ที่มีมวลโมเลกุล 200 กิโลดาลตัน และสายแกมมา ( $\gamma$ -chain) ที่มีมวลโมเลกุล 300 กิโลดาลตัน ตลอดจนไมโครเจล (microgel) ที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 300 กิโลดาลตัน พบว่ามีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงเจลเพียงเล็กน้อย แต่สัมพันธ์อย่างมากกับค่าความหนืด เจลาตินสามารถพองตัวเมื่ออยู่ในน้ำโดยสามารถดูดน้ำได้ 5-10 เท่าของปริมาตรเดิม เจลาตินจึงมีสมบัติการดูดน้ำที่ดี (ธัญลักษณ์, 2556) ซึ่งสามารถหารูปแบบของโปรตีนเจลาตินได้จากการวิเคราะห์ SDS-PAGE ซึ่งรูปแบบของโปรตีนเจลาตินที่สกัดได้จะประกอบด้วยสายโซ่  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  และ  $\beta$  (โดเมอร์ของสายโซ่  $\alpha$ ) เป็นองค์ประกอบหลักของเจลาตินซึ่งในการสกัดเจลาตินเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการสกัดเพิ่มสูงขึ้น ความเข้มข้นของแถบโปรตีนสายโซ่  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  และ  $\beta$  (โดเมอร์ของสายโซ่  $\alpha$ ) รวมถึงโปรตีนหรือพันธะเปปไทด์ที่มีโมเลกุลสูงจะจางลง ซึ่งสามารถบอกได้ว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้เกิดพันธะเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลลดลง เนื่องจาก ความร้อนที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดในการเปลี่ยนคอลลาเจนเป็นเจลาติน จะทำลายพันธะโควาเลนต์ และนอนโควาเลนต์ทั้งในและระหว่างสายโซ่  $\alpha$  และพันธะเปปไทด์ ซึ่งพันธะเปปไทด์บางส่วนจะถูกทำลาย ดังนั้นในสารสกัดเจลาตินจึงประกอบไปด้วยพันธะเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลและความยาวของสายที่หลากหลาย ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของพันธะที่ถูกทำลาย การย่อยสลายของเจลาตินจะเกิดเป็นพันธะเปปไทด์สายสั้นที่มีโมเลกุลต่ำ ส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาตินลดลง เช่น ค่าความแข็งแรงเจล, สมบัติความยืดหยุ่นและอุณหภูมิในการเกิดเจลต่ำ ทั้งนี้นอกจากสายโซ่  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  และ  $\beta$  และพันธะเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของเจลาตินแล้ว อาจมีโปรตีนชนิดอื่นปะปนมาด้วยซึ่งอาจเกิดจากการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเบื้องต้นที่ไม่สมบูรณ์ (สินีนาด, 2555) เช่นเดียวกับในงานวิจัยผลจากการปรับสภาพเท้าเปิดด้วยสารละลายกรด ต่าง และเอนไซม์ ต่อผลผลิตของเจลาติน (รูปที่ 2.5) (Abedinia และคณะ, 2017)



ภาพที่ 2.5 รูปแบบของโปรตีนเจลาตินที่ได้จากการวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่สกัดจากเท้าเปิดโดยการปรับสภาพที่แตกต่างกัน จากการใช้สารละลายกรด ต่าง และเอนไซม์ ตามลำดับ

ที่มา : Abedinia และคณะ (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.4.2.1 ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อสมบัติความแข็งแรงเจลเจลาติน

2.4.2.1.1 ความเข้มข้นของเจลาติน ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และความแข็งแรงเจลจะขึ้นอยู่กับชนิด และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเจลาติน ซึ่งคำนวณค่าความแข็งแรงเจล สามารถคำนวณได้จากสมการ  $b=kC^n$  โดยที่  $b$  คือความแข็งแรงเจล (Bloom strenght)  $n$  คือความเข้มข้นของเจลาตินที่ใช้ทดสอบ,  $k$  คือ อัตราส่วนคงที่,  $C$  คือ ความเข้มข้นของเจลาติน ( $w/w$ ) และ  $n$  เป็นค่าที่จะเปลี่ยนแปลงตามชนิดของเจลาติน สำหรับเจลาตินที่มีความแข็งแรงเจลสูงมีค่าเท่ากับ 1.7 และเจลาตินที่มีความแข็งแรงเจลต่ำกว่าจะมีค่าประมาณ 1.8-1.9 สำหรับสมบัติการเกิดเจล (อัญลักษณ์, 2556)

2.4.2.1.2 ค่ากรด-ด่าง และความแรงของประจุมีความสำคัญต่อค่าความแข็งแรงเจล โดยเฉพาะในสภาวะที่มีค่ากรด-ด่างสูง และค่ากรด-ด่าง ระหว่าง 4-9 ไม่ส่งผลต่อค่าความแข็งแรงเจล โดยที่ค่ากรด-ด่าง จะส่งผลต่อการเกิดเจลของเจลาตินที่มีความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่าร้อยละ 2) มากกว่าเจลาตินที่มีความเข้มข้นสูง (มากกว่าร้อยละ 10) ค่ากรด-ด่าง และความแรงประจุ มีความสำคัญต่อสมดุลของประจุในโมเลกุลของโปรตีนและทำให้เกิดโครงข่ายของเจลที่แข็งแรง (Widyasari และ Rawdkuen, 2014)

2.4.2.1.3 อุณหภูมิ และระยะเวลาการเกิดเจล ค่าความแข็งแรงของเจลจะขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ และระยะเวลาการเกิดเจล โดยที่ค่าความแข็งแรงของเจลจะลดลง เมื่ออุณหภูมิการเกิดเจลเพิ่มขึ้น และความแข็งแรงของเจลจะแปรผันตรงกับระยะเวลาการเกิดเจล (Kittiphattanabawon และคณะ, 2016)

#### 2.4.3 ความหนืด (Viscosity)

เป็นคุณสมบัติที่รองลงมาจากความแข็งแรงของเจล สิ่งที่ต้องควบคุมในระหว่างการวัดคือ อุณหภูมิ เนื่องจากถ้าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจะทำให้ค่าความหนืดเปลี่ยนแปลงไปด้วย เจลาตินที่มีความหนืดสูงจะมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น มักใช้สำหรับการทำให้อิมัลชันคงตัว อย่างไรก็ตาม ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตลูกกวาดที่ต้องขึ้นรูปจะนิยมใช้เจลาตินชนิดความหนืดต่ำเพื่อป้องกันการไหลตามเป็นเส้น (Tailing effect) ในขณะที่การผลิตฟิล์มเจลาตินนิยมใช้เจลาตินความหนืดสูง วิชามาตรฐานในการวัดความหนืด คือ การใช้ปิเปต โดยวัดระยะเวลาการไหลออกของสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 6.67 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และรายงานผลในรูป เมกะปาสคาร์ล ในการใช้งานบางอย่างอาจวัดโดยใช้เครื่องวัดความหนืด (Rotary viscometer) เครื่องรีโอมิเตอร์ หรืออุปกรณ์อื่นๆ กับสารละลายเจลาตินที่มีความเข้มข้นและอุณหภูมิแตกต่างกัน (Cole, 2000)

#### 2.4.4 สี (Color)

เจลาตินคุณภาพสูงควรจะไม่มีส่วนสีสว่างอำพันหรือสีเหลืองจางๆ เจลาตินคุณภาพต่ำจะให้ลักษณะไม่โปร่งใสจนถึงขุ่นหรือมีสีเหลืองส้ม มักเกิดกระบวนการผลิตที่ไม่ดี นอกจากนี้ เจลาตินจะต้องไม่มีกลิ่นแปลกปลอม (Odorless) และไม่ไร้รสชาติ (Tasteless) (ฐิตินันท์ และคณะ, 2554)

#### 2.4.5 ความขุ่น (Turbidity)

ความขุ่นเกิดจาก Insoluble impurities ที่มาจากขั้นตอนการสกัดจะมีผลต่อค่าความใส ความหนืด และความแข็งแรงเจลเจลาติน (Schrieber และ Gareis, 2007) เมื่อใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนการปรับสภาพและการสกัดเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลต่อค่าความขุ่นที่เพิ่มขึ้นด้วย (Kittiphattanabawon และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.4.6 การเกิดโฟม

เจลาตินเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้โฟมคงตัว โฟมเป็นฟองอากาศขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในของเหลว หรือของแข็ง โดยมีฟิล์มบางๆ ล้อมรอบอากาศไว้ เกิดจากการตีหรือปั่น (Beating or whipping) อย่างรุนแรง (Cole, 2000)

#### 2.4.7 การหลอมเหลวและการผันกลับ

การเกิดเจลเป็นสมบัติของเจลาติน แต่เมื่อเวลาได้รับอุณหภูมิที่สูงขึ้นเจลจะเกิดการหลอมเหลว เรียกอุณหภูมิที่เจลหลอมเหลวว่า จุดหลอมเหลวของเจล ( $T_m$ ) ซึ่งจุดหลอมเหลวของเจลาตินมักจะมีค่าอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิของร่างกายมนุษย์ จุดหลอมเหลวของเจลาตินจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเจลาตินชนิดนั้นๆ (ธัญลักษณ์, 2556)

#### 2.4.8 การเป็นอิมัลซิไฟเออร์

เจลาตินเป็นอิมัลซิไฟเออร์ชนิดน้ำมันในน้ำ เป็นสารให้ความคงตัว (Leiner, 2010) โดยเพิ่มความหนืดของเฟสน้ำ อย่างไรก็ตาม ความหนืดของเจลาตินขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต เจลาตินชนิด A ซึ่งปรับสภาพด้วยกรดมีความหนืดประมาณครึ่งหนึ่งของเจลาตินชนิด B ซึ่งปรับสภาพด้วยด่าง ดังนั้นเจลาตินชนิด B จึงเหมาะสมสำหรับทำให้อิมัลชันคงตัว (Schrieber และ Gareis, 2007)

### 2.5 มาตรฐานในการตรวจสอบคุณสมบัติของเจลาติน

2.5.1 ความแข็งแรงเจล (Gel strength) เป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่สุดของเจลาติน การวัดจะวัดการต้านทานต่อแรงกด โดยนิยมวัดเป็นค่าบลูม (Bloom strength) ด้วยเครื่อง Bloom Gelometer Ali และคณะ (2016) อุณหภูมิ ระยะเวลา และองค์ประกอบของกรดอะมิโนมีผลต่อความแข็งแรงเจล จากการศึกษาของ Monsur และคณะ (2014) ผลจากการปรับสภาพหนังปลากระพงต่อคุณสมบัติของเจลาติน โดยนำของเหลวที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 3.3% ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บไว้ใน Flat bottom gel jar (ขนาด 31 มิลลิเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางสูง 25 มิลลิเมตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $17 \pm 1$  ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส รุ่น TA-XT2 (Texture Technologies Corp., USA) โดยการเจาะขนาด 5 กิโลกรัม เข้าไปในเจลาตินด้วยความเร็ว 1 มิลลิเมตร/วินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.2 ความหนืด (Viscosity) เป็นคุณสมบัติที่รองลงมาจากความแข็งแรงของเจล สิ่งที่ต้องควบคุมในระหว่างการวัดคือ อุณหภูมิ เนื่องจากถ้าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจะทำให้ค่าความหนืดเปลี่ยนแปลงไปด้วย (ธัญลักษณ์, 2556) จากการศึกษาของ Abedinia และคณะ (2017) ผลจากการปรับสภาพเท้าเปิดด้วยสารละลายกรด ด่าง และเอนไซม์ ต่อผลผลิตของเจลาติน โดยการนำเจลาตินแห้งมาละลายในน้ำกลั่นโดยให้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 6.67% (w/v) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาทดสอบสมบัติทางรีโอโลยีโดยใช้เครื่อง Broad-range-controlled rheometer รุ่น (AR1000-N, TA Instruments, UK) โดยใช้หัวแบบโคนและแผ่นเรียบ (มุมกรวยขนาด 2 องศา, ช่องว่างระหว่างโคนกับแผ่นเรียบขนาด 0.54 เมตร) ซึ่งสามารถอธิบายความหนืดในโครงสร้างของเจลาตินโดยดูจากค่าการยืดหยุ่นของมอดูลัส ( $G'$ )

2.5.3 สี เจลาตินคุณภาพสูงควรจะไม่มียีสจนถึงสีสว่างอำพันหรือสีเหลืองจางๆเจลาตินคุณภาพต่ำจะให้ลักษณะไม่โปร่งใสจนถึงขุ่นหรือมีสีเหลืองเข้ม มักเกิดกระบวนการผลิตที่ไม่ดี นอกจากนี้ เจลาตินจะต้องไม่มีกลิ่นแปลกปลอม (Odorless) และไม่ให้รสขชาติ (Tasteless) (ฐิตินันท์ และคณะ, 2554)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 ปริมาณแบคทีเรียในการผลิตจะต้องระวังมาก เนื่องจากในบางครั้งไม่มีการอนุญาตให้ใช้สารกันเสีย (Preservative) ตามมาตรฐานอนุญาตให้มีแบคทีเรียได้ไม่เกิน  $1 \times 10^3$  กรัม และจะต้องไม่พบ *salmonella sp.* และ *Escherichia coli* ถ้าพบว่าเจลาตินมีค่ากรด-ด่างน้อยกว่า 4 แบคทีเรียจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ถ้าเจลาตินมีค่ากรด-ด่างสูงกว่า 5 อาจทำให้พบ Proteolytic bacteria ได้ (ธัญลักษณ์, 2556)

2.5.5 การทดสอบทางด้านเคมี เช่น ความชื้น เถ้า ฟอสเฟต เจลาตินที่อยู่ในรูปของแห้งควรมีความชื้นประมาณร้อยละ 10-12 ปริมาณความชื้นนี้สามารถเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงร้อยละ 7-15 ได้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการอบแห้งระยะเวลาการเก็บรักษา ปริมาณเถ้ากำหนดไม่เกินร้อยละ 2 ถ้าเป็นเจลาตินคุณภาพสูงจะมีปริมาณเถ้าต่ำกว่าร้อยละ 0.5 ซึ่งปริมาณเถ้านี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาสกัด ถ้าต้องการให้มีระดับเถ้าต่ำ จะต้องนำมากรองผ่าน Ion exchange เพื่อกำจัดพวกแร่ธาตุต่างๆ (Demineralizing) ออก ค่ากรด-ด่าง ควรอยู่ในช่วง 4-7 ถ้าเป็นเจลาตินคุณภาพสูง จะมีค่า กรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.0-5.8 (Harris, 1990)

## 2.6 หลักการเทคโนโลยีอัลตราซาวด์

ในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำเทคโนโลยีอัลตราซาวด์มาช่วยในกระบวนการผลิตต่างๆ รวมทั้งการเก็บรักษาอาหาร เนื่องจากอัลตราซาวด์สามารถลดระยะเวลาในกระบวนการผลิตและลดพลังงานลงได้ (Ercan และ Soysal, 2013) การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการการสกัดเจลาตินเป็นทางเลือกใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มคุณภาพและผลผลิตของเจลาติน ซึ่งอัลตราซาวด์หรืออัลตราโซนิก เป็นคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงกว่า 20 KHz ขึ้นไป จะสูงขึ้นจนถึงเท่าใดไม่ได้ระบุจำกัดเอาไว้ ซึ่งเป็นความถี่ที่สูงเกินกว่าที่ประสาทหูมนุษย์จะได้ยิน โดยทั่วไปแล้วหูของมนุษย์โดยเฉลี่ยจะได้ยินเสียงสูงถึงเพียงแค่ประมาณ 15 KHz สมบัติเด่นของคลื่นอัลตราซาวด์ คือเป็นคลื่นที่มีทิศทางทำให้เราสามารถกำหนดคลื่นเสียงไปยังเป้าหมายที่ต้องการได้โดยเจาะจงโดยไม่มีการเลี้ยวเบนที่ขอบซึ่งพุ่งออกมาเป็นลำแคบๆ หรือที่เรียกว่า มีทิศทาง มีการนำเอาคลื่นอัลตราซาวด์มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งเพื่อการตรวจวัดคุณภาพ และใช้ในการแปรรูปอาหาร (Food processing) เช่น การสกัด (Sonication) การทำให้เกิดอิมัลชัน (Emulsification) การทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ และแบคทีเรีย เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร ซึ่งอาจใช้ร่วมกับเทคนิคอื่น เช่น การแปรรูปด้วยความร้อน (Thermal processing) การใช้ความดันสูง นอกจากนี้คลื่นอัลตราซาวด์ยังนำมาใช้ในการล้างทำความสะอาด (Washing) วัตถุดิบ เช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร โดยให้น้ำเกิดการสั่นที่ความถี่สูงซึ่งสิ่งสกปรกจะหลุดออกมาได้ง่ายขึ้น (Huang และคณะ, 2017; Tu และคณะ, 2013; Widayars และคณะ, 2014)

### 2.6.1 การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในกระบวนการแปรรูปอาหาร แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่

2.6.1.1. การใช้อัลตราซาวด์ที่กำลังต่ำหรือความถี่สูง (Low Power or High Frequencies) มีความถี่อยู่ในช่วงประมาณ 100 KHz – 1 MHz ซึ่งใช้ในด้านการวิเคราะห์เป็นส่วนใหญ่ (Altaf และคณะ, 2018)

2.6.1.2. การใช้อัลตราซาวด์ที่กำลังสูงหรือความถี่ต่ำ (High Power or Low Frequencies) ที่เรียกว่า พาวเวอร์อัลตราซาวด์ (Power ultrasound) มีความถี่อยู่ในช่วงประมาณ 20 KHz – 100 KHz ซึ่งมักนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร (Altaf และคณะ, 2018)

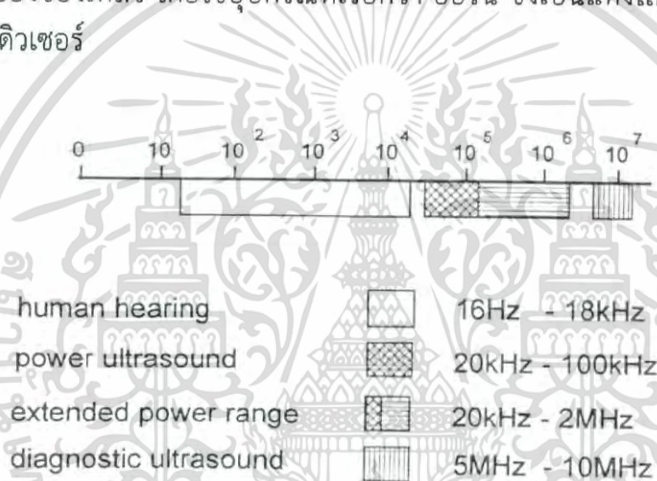
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6.2 เครื่องอัลตราซาวด์จะมีอุปกรณ์ที่สำคัญและจำเป็นอยู่ 3 ส่วน

2.6.2.1 เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า (Generator) โดยการเปลี่ยนกระแสไฟฟ้ากระแสตรงไปเป็นกระแสสลับที่ความถี่ที่ต้องการและผ่านเข้าสู่ทรานส์ดิวเซอร์

2.6.2.2 ทรานส์ดิวเซอร์ ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนไฟฟ้ากระแสสลับความถี่สูงไปเป็นการสั่นเนื่องจากพลังงานกล โดยที่รูปร่างและขนาดของทรานส์ดิวเซอร์ที่นำมาประกบกันจะขึ้นอยู่กับความถี่ที่ต้องการใช้งานและพลังงานจากทรานส์ดิวเซอร์แต่ละชนิดจะแปรผกผันกับกำลังสองความถี่ ดังนั้นในการประยุกต์ใช้พาวเวอร์อัลตราซาวด์ที่มักใช้ใน ช่วงความถี่ต่ำ โดยทรานส์ดิวเซอร์จะอยู่ติดกับบูสเตอร์ (Booster) หรือฮอร์น (Horn) ด้านบนและเชื่อมต่อกับระบบส่งถ่ายพลังงาน

2.6.2.2 ระบบส่งถ่ายพลังงาน (Delivery systems) ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งถ่ายพลังงานจากการสั่นสะเทือนไปยังของเหลว ในกรณีที่เป็นอ่างอัลตราซาวด์ ตัวทรานส์ดิวเซอร์ จะอยู่บริเวณฐานตรงด้านล่างของตัวอ่างหรือถังและส่งถ่ายพลังงานโดยตรงไปยังของเหลวที่อยู่ภายในอ่าง ส่วนระบบที่ต้องการพลังงานไปยังของเหลว โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า ฮอร์น ซึ่งเป็นแท่งโลหะที่มีรูปร่างแตกต่างกันและจะติดกับทรานส์ดิวเซอร์



ภาพที่ 2.6 คลื่นความถี่ของอัลตราซาวด์ในช่วงต่าง ๆ  
ที่มา : Mason (1998)

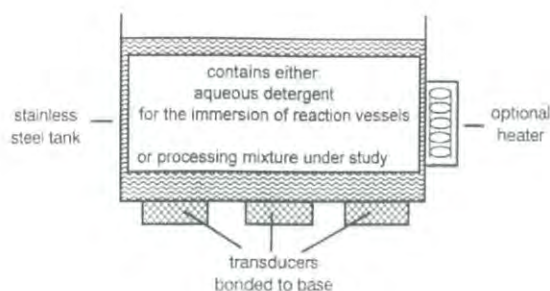
## 2.6.2 ประเภทของเครื่องอัลตราซาวด์ (Ultrasonic reactor)

เครื่องอัลตราซาวด์เป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันมีความแตกต่างกันตรงที่การออกแบบแหล่งกำเนิดไฟฟ้า แหล่งกำเนิดคลื่น และตัวเครื่องที่ใช้ร่วมกับแหล่งกำเนิดคลื่นโดยสามารถแบ่งเป็นชนิดต่างๆ ดังนี้

### 2.6.2.1 อ่างอัลตราซาวด์ (Ultrasonic baths)

อ่างอัลตราซาวด์เป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายและมีการนำมาใช้เป็นเวลานานแล้วโดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีราคาไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องที่ใช้ระบบโพรบสำหรับอ่างอัลตราซาวด์นั้นพลังงานสูงสุดที่สร้างได้จะอยู่ตรงบริเวณระดับความสูงค่าหนึ่งตลอดความสูงของอ่าง ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดคลื่นจากการสะท้อน (Reflection) ของคลื่นอัลตราซาวด์ที่ถูกสร้างขึ้นตรงบริเวณรอยต่อระหว่างอากาศและของเหลว

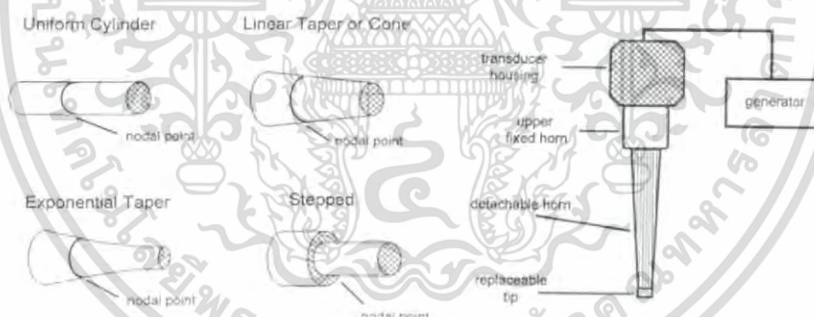
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.7 อ่างอัลตราซาวด์  
ที่มา: Mason (1998)

#### 2.6.2.2 ระบบอัลตราซาวด์แบบโพรบ (Ultrasonic probe systems)

ในการขยายพลังงานหรือคลื่นเสียงที่เกิดขึ้นจากทรานส์ดีวเซอร์นั้น โดยทั่วไปจะนำทรานส์ดีวเซอร์มาต่อเข้ากับอุปกรณ์ที่เรียกว่า ฮอร์น (Horn) ลักษณะของฮอร์นจะมีความแตกต่างกันออกไปดัง (ภาพที่ 2.11) แอมพลิจูดที่สร้างขึ้นจากระบบนี้จะขึ้นกับรูปร่างลักษณะของฮอร์น สำหรับฮอร์นที่มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอก (Uniform cylinder) นั้นแอมพลิจูดจะไม่มีเปลี่ยนแปลง แต่ฮอร์นจะทำหน้าที่ขยายหรือเพิ่มการส่งถ่ายพลังงานเสียง และที่แอมพลิจูดสูงจะมีข้อจำกัด เนื่องจากฟองอากาศที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวจากปฏิกิริยาควิวเตชันจะรบกวนการส่งถ่ายของพลังงานไปยังของเหลว Mason (1998)

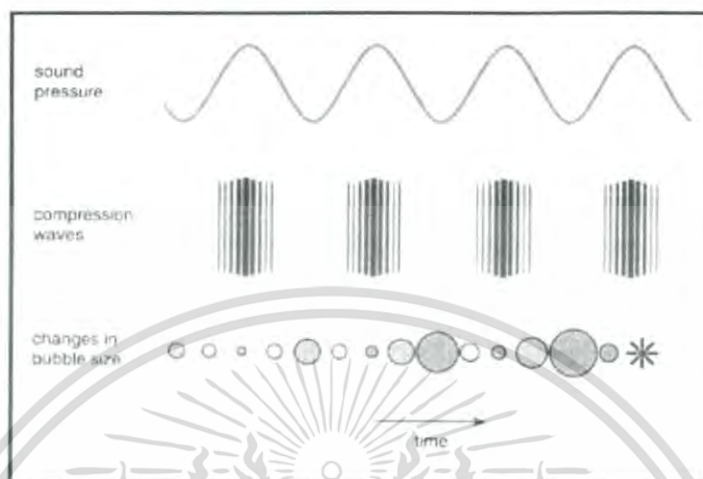


ภาพที่ 2.8 ลักษณะของฮอร์นชนิดต่างๆ และระบบอัลตราซาวด์แบบโพรบ  
ที่มา: Mason (1998)

โดยอัลตราซาวด์จะให้พลังงานแก่กระบวนการโดยการสร้างคลื่นความดัน ซึ่งคลื่นจะถูกสร้างขึ้นมาระหว่างกระบวนการ “sonication” คลื่นจะเคลื่อนที่ผ่านส่วนที่เป็นตัวกลาง (ของเหลว) และสร้างแรงบีบอัด และการขยายตัว กระบวนการนี้เกิดโพรงอากาศ (Cavitation) ที่จะเกิดการแตกตัว (Implosion) ต่อไป (Butz และ Tauscher, 2002) การแตกตัวของโพรงอากาศจะสร้างช่องว่างขนาดใหญ่ที่มีปริมาตรมากภายในอนุภาคทำให้เกิดการชน และรบกวนต่ออนุภาคของวัสดุที่นำมาสกัด ซึ่งสามารถเพิ่มความรวดเร็วในกระบวนการแพร่ของตัวกลาง และการแพร่ภายในอนุภาคของวัสดุ (Vilkhu และคณะ, 2008) ด้วยกลไกของการสั่นสะเทือนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดจากการแตกตัวของโพรงอากาศ และกระจายเข้าไปภายในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การไหลผ่านของสารละลายเข้าออกเซลล์เป็นไปได้ยิ่งขึ้น และได้ผลผลิตจากการสกัด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากและบริสุทธิ์มากขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้อัลตราซาวด์มากเกินไปจะเกิดการสูญเสียพลังงานอย่างสูญเปล่า จึงควรใช้อัลตราซาวด์ในกระบวนการการสกัดในสภาวะที่เหมาะสมเท่านั้น เพื่อรักษาต้นทุนและความเป็นไปได้ทางเศรษฐกิจที่มากขึ้น (Romdhane และ Gourdon, 2002)



ภาพที่ 2.9 การเกิดฟองอากาศในตุ๊กกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์  
ที่มา: Suslick (1994)

### 2.6.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ระบบแผ่นสั่นคู่ขนาน (Equipment involving parallel vibrating plates)

ระบบนี้พบว่าเป็นทางเลือกที่ดีในการนำคลื่นอัลตราซาวด์มาใช้กับงานที่มีลักษณะต่อเนื่อง โดยผลิตภัณฑ์จะได้รับคลื่นอัลตราซาวด์สม่ำเสมอในระหว่างทางที่ไปยังเครื่องอัลตราซาวด์ จะทำให้เกิดการสั่นที่บริเวณผนังด้านในตัวเครื่อง เมื่อแผ่นดังกล่าวเคลื่อนที่เข้ามาใกล้กันมากขึ้นจะมีผลทำให้การลดทอนพลังงาน (Attenuation) ของคลื่นเสียงภายในของเหลวมีค่าต่ำสุดและไม่เกิดคลื่น

### 2.6.2.4 ระบบการสั่นตามแนวรัศมี (Radial vibrating systems)

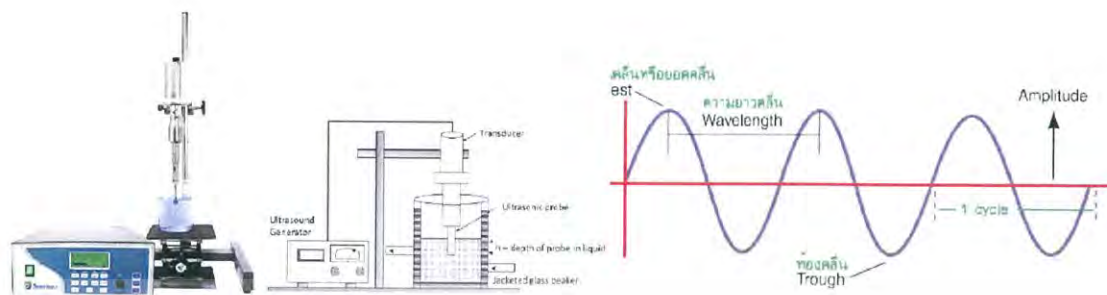
ในการให้พลังงานคลื่นอัลตราซาวด์กับของเหลวที่ไหลอยู่ภายในท่อนั้น วิธีที่ดีที่สุดคือการใช้การสั่นของท่อเพื่อทำให้เกิดคลื่นพลังงานขึ้น ซึ่งจะทำให้อัตราการไหลมีค่าสูงขึ้นรวมทั้งใช้ได้กับผลิตภัณฑ์ที่มีความข้นหนืดสูง

แอมพลิจูด (Amplitude, A) คือขนาดของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการแกว่งตัวในระบบ ตัวอย่างเช่น คลื่นเสียง คือการแกว่งตัวของแรงดันในบรรยากาศ แอมพลิจูดของมันเป็นคือการเปลี่ยนแปลงของแรงดันในแต่ละรอบ ถ้าการเปลี่ยนแปลงนี้อยู่ในคาบการแกว่งตัวปกติ จะสามารถวาดเส้นกราฟของระบบออกมาโดยให้ค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นแกนตั้ง และเส้นเวลาเป็นแกนนอน แสดงให้เห็นภาพของแอมพลิจูดเป็นการเปลี่ยนแปลงขนาดขึ้นลงในแนวตั้งระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุด (Knopp และ Bagemihl, 1996)

ความถี่ (Frequency) คือ จำนวนการเกิดเหตุการณ์ซ้ำในหนึ่งหน่วยของเวลา หรือ ความถี่ของคลื่นมีความสัมพันธ์กับความยาวคลื่น กล่าวคือความถี่ (f) มีค่าเท่ากับความเร็ว (v) ของคลื่นหารด้วยความยาวคลื่น ( $\lambda$  (lambda)) :  $f = \frac{v}{\lambda}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาบการเคลื่อนที่ (Period ; T) คือ เวลาที่คลื่น 1 คลื่น เคลื่อนที่ผ่านจุดใด ๆ ในระบบ SI มีหน่วยเป็นวินาที (s)



ภาพที่ 2.10 เครื่องอัลตราซาวด์และลักษณะของคลื่นอัลตราซาวด์  
ที่มา : <https://th.wikipedia.org>

ในปัจจุบันจึงได้มีการใช้อัลตราซาวด์มาช่วยในกระบวนการการสกัดสารต่างๆ มากมาย รวมถึงการสกัดเจลาตินจากแหล่งต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ เจลาตินที่สกัดโดยมีการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดจะทำให้เพิ่มปริมาณผลผลิต (%Yield), ความแข็งแรงเจล, จุดหลอมเหลว, ความหนืด และยังสามารเพิ่มปริมาณโปรตีนในเจลาตินที่สกัดได้อีกด้วย เนื่องจากการให้พลังงานโดยการสั่นภายในเยื่อหุ้มเซลล์ และผนังเซลล์ ทำให้โปรตีนและเจลาตินหลุดออกมาเป็นผลผลิตได้ง่ายขึ้น การให้พลังงานด้วยอัลตราซาวด์ร่วมกับการใช้ความร้อนในกระบวนการสกัดทำให้สามารถลดอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในกระบวนการการสกัดเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สภาวะที่รุนแรงซึ่งจะทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนและเจลาติน จึงสามารถรักษาคุณภาพของเจลาตินไว้ได้และยังช่วยลดการสิ้นเปลืองเวลาขณะทำการสกัดอีกด้วย (Huang และคณะ, 2017; Tu และคณะ, 2013; Widyasar และคณะ, 2014) การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการการสกัดเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพทั้งในการสกัดในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมยา (Zhang และคณะ, 2008) การเพิ่มขึ้นของผลผลิตจากการสกัดด้วยอัลตราซาวด์จากการสั่นสะเทือนของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการแพร่ของสารละลายภายในเซลล์ ส่งผลให้ผลผลิตออกมาจากวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น (Zhang และคณะ, 2008) ซึ่งนอกจากช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตของกระบวนการการสกัดแล้วยังช่วยเพิ่มคุณสมบัติของเจลาตินได้อีกด้วย (Arzeni และคณะ, 2012)

## 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยหลายๆ ฉบับที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้อัลตราซาวด์ในการสกัดเจลาตินจากแหล่งโปรตีนคอลลาเจนต่างๆ เช่น การปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้นโดยการนำอัลตราซาวด์มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการปรับสภาพ Nhat และคณะ (2016) ได้นำอัลตราซาวด์มาช่วยในการปรับสภาพหนังปลาหูช้างที่สภาวะแตกต่างกันของแอมพลิจูดที่ (50-100%), คาบการเคลื่อนที่ (0.6-1.0 s/s) และระยะเวลา (60-120 นาที) และศึกษาผลของอัลตราซาวด์ต่อคุณภาพของเจลาตินที่ได้ พบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายต่างโดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยที่แอมพลิจูด 80%, คาบการเคลื่อนที่ที่ 0.8 s/s เป็นเวลา 90 นาที ให้ผลผลิตเจลาตินและความแข็งแรงเจลสูงที่สุดเท่ากับ 22.7% และ 143.3 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับอื่นๆ ในขณะที่เดียวกันการปรับสภาพด้วยต่างโดยใช้อัลตราซาวด์ร่วมกับกรดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ผลผลิตของเจลาตินและความแข็งแรงเจลต่ำ เนื่องจากหนังปลาหูนาเสียหายจากการใช้สารละลายกรด ทำให้โครงสร้างพันธะเปปไทด์ของคอลลาเจนถูกตัดเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ซึ่งทำให้ถูกกำจัดออกไปในระหว่างขั้นตอนการล้างก่อนการสกัด (Nhat และคณะ, 2016) มีการนำอัลตราซาวด์มาช่วยในการปรับสภาพหนังปลาหางบัว จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้อัลตราซาวด์ถูกนำมาใช้ในการปรับสภาพหนังปลาหางบัวจะถูกปรับสภาพโดยการแช่ในกรดที่แตกต่างกัน (กรดอะซิติก 0.05 M นาน 2 ชั่วโมง และ กรดซัลฟิวริก 0.02 M ผสมกับ 0.05 M กรดอะซิติก เป็นเวลา 15 นาที) แล้วนำมาสกัดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ที่ใช้และไม่ได้อัลตราซาวด์ เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าการใช้กรดที่แตกต่างกันในการปรับสภาพหนังปลามีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดเจลาตินและคุณสมบัติของเจลาตินที่ได้ การใช้อัลตราซาวด์ในขั้นตอนการปรับสภาพด้วยความถี่ 20 kHz แอมพลิจูด 80% การปรับสภาพด้วยกรดร่วมกันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้ผลผลิตสูงสุด ( $62.12 \pm 1.52\%$ ) อย่างไรก็ตามความแข็งแรงเจลลดลงเมื่อใช้กรดร่วมกับอัลตราซาวด์ในการปรับสภาพหนังปลา (Ali และคณะ, 2018) นอกจากนี้ยังมีการนำอัลตราซาวด์มาใช้ร่วมกับการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ Actinidin และ Bromelain ในการสกัดเจลาตินจากหนังปลาหัว (*Aluterus monoceros*) การใช้อัลตราซาวด์ (53kHz, 500W) ปรับสภาพหนังปลาหัวก่อนนำมาสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเจลาตินมากที่สุด แต่ในทางกลับกันเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพด้วยอัลตราซาวด์มีผลต่อความแข็งแรงเจล โดยทำให้ความแข็งแรงเจลลดลงเมื่อใช้การปรับสภาพด้วยอัลตราซาวด์นานขึ้น แสดงให้เห็นว่าการใช้อัลตราซาวด์นานเกินไปทำให้โปรตีนเจลาตินเสียหายได้ (Ahmad และคณะ, 2018) Widyasar และคณะ (2014) ได้ทำการสกัดเจลาตินจากเกล็ดปลา (Bighead carb scales) โดยใช้ อัลตราซาวด์เข้ามาช่วยในกระบวนการการสกัด พบว่าการใช้อัลตราซาวด์เข้ามาช่วยในกระบวนการการสกัดส่งผลดีกับเจลาตินที่สกัดได้ ทั้งความแข็งแรงเจล, จุดหลอมเหลว, ความหนืด และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเทียบกับการสกัดที่สภาวะอุณหภูมิและเวลาการสกัดเดียวกันในกระบวนการการสกัดที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และเมื่อศึกษาผลของสภาวะในการสกัด ได้แก่ อุณหภูมิ และเวลา พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัดทำให้ผลผลิตเจลาตินที่ได้สูงขึ้น แต่ส่งผลเสียต่อคุณสมบัติเชิงคุณภาพของเจลาตินเช่น ความแข็งแรงเจล, จุดหลอมเหลว และความหนืดที่ลดลง ซึ่งเป็นผลจากสภาวะการสกัดที่รุนแรงเกินไป ส่งผลต่อการเสียหายของเจลาตินเป็นสายเล็กๆ เกิดเป็นโครงข่ายที่ไม่แข็งแรงจึงทำให้เจลาตินที่ได้ไม่แข็งแรง ด้วยการสกัดเจลาตินไม่ว่าจะจากแหล่งโปรตีนใดๆ จึงควรใช้วิธีการสกัดและสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลผลิตเจลาตินที่สูงและมีคุณภาพ (Huang และคณะ, 2017; Tu และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

##### 3.1.1 วัตถุดิบ

หนังของกบเสือ (*R. tigerina*) ที่มีน้ำหนัก 200-300 กรัมต่อตัว ซึ่งหาซื้อได้จากตลาดในพื้นที่เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย หนังกบแช่น้ำแข็งอัตราส่วน 1:2 (w/w) ในกล่องโฟมและส่งไปยังคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใน 1 ชั่วโมง เมื่อมาถึงหนังกบถูกล้างในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 1-3 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปใส่ถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเก็บไม่น้อยกว่า 2 เดือน ก่อนการสกัดเจลาติน นำหนังที่แช่แข็งมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด  $1.0 \times 1.0 \text{ cm}^2$  โดยใช้เครื่อง Electric sawing machine รุ่น (Union, Kitchen, Thailand)

##### 3.1.2 สารเคมี

กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	Merck, Germany
โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )	Ajax, Australia
ทริส (Tris(hydroxymethyl) aminomethane)	Ajax, Australia
โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ )	Ajax, Australia
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS)	Merck, Germany
โซเดียมอะซิเตท ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ )	Ajax, Australia
ไตรโซเดียมซิเตรท ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )	Ajax, Australia
กรดซิตริก ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )	Ajax, Australia
p-dimethyl amino benzaldehyde	Ajax, Australia
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, America
Beta-Mercaptoethanol	Ajax, Australia
ไดโซเดียมฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Ajax, Australia
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Ajax, Australia
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Ajax, Australia
เมทิลีนบลู	Sigma, America
คลอรามินที (Chloramine T )	Ajax, Australia
Coomassie Blue R-250	Ajax, Australia
คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4$ )	Ajax, Australia
โพแทสเซียมซัลเฟต ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )	Ajax, Australia
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Merck, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ไมโครปิเปต (Micropipette)	
กล่องพลาสติกสำหรับย้อมเจล	
แท่งแก้วคนสาร ( Stiring Rod )	
กระบอกตวง (Cylinder)	
ช้อนตักสาร (Spatula)	
ถ้วยอะลูมิเนียมสำหรับหาคความชื้น	
แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)	
ปากคีบ (Forcep)	
ปิเปต (Graduated pipette)	
อะลูมิเนียมฟอยล์	
ผ้าขาวบาง	
บีกเกอร์	Duran, Germany
ขวดชมพู่ (Erlenmeyer flask)	Duran, Germany
หลอดเซนติฟิวส์พลาสติก (Centrifuge tube)	Fisher Scientific, England
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer)	Mapada, China
เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง	Mettler Toledo, Switzerland
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert, Germany
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath)	Memmert, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Thermo Scientific, Germany
เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)	IKA, Germany
ตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven)	Memmert, Thailand
เตาไฟฟ้า (Hot plate)	IKA, Germany
เครื่องวัดสี (Hunter lab)	Coloe Quest XE, USA
เครื่องวัดเนื้อสัมผัส(Texture analyzer)	TA-XT2 Surrey, UK
เครื่องอัลตราโซนิก	Sonics, Model VC750, USA
เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)	Lynge, Denmark
เครื่อง Electric sawing machine	Kitchen, Thailane

## 3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

### 3.3.1 การเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด

#### 3.3.1.1 การกำจัดส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนคอลลาเจนในหนังกบ

นำหนังกบที่เตรียมได้ แช่ในสารละลายต่าง NaOH ความเข้มข้น 0.3 M ด้วยอัตราส่วนหนังต่อสารละลายต่างที่ 1:10 (w/v) และกวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนสาร รุ่น C-MAG HS10 (IKA, Germany) ที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทุกๆ 2 ชั่วโมง ทั้งหมด 2 ครั้ง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ค่าพีเอชเป็นกลาง (พีเอช 7.0-7.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.1.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด

นำหนังสือที่ได้จากการกำจัดส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนคอลลาเจนเรียบร้อยแล้ว แช่ในสารละลายกรด  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ความเข้มข้น 0.15 M ด้วยอัตราส่วนหนึ่งต่อสารละลายกรดที่ 1/10 (w/v) และกวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนสาร ที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ค่าพีเอชเป็นกลาง (พีเอช 6.5-7.0)

### 3.3.2 การสกัดเจลาติน

#### 3.3.2.1 การสกัดเจลาตินแบบวิธีดั้งเดิม

นำหนังสือที่ปรับสภาพเรียบร้อยแล้วปริมาณ 40 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 320 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่องในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า รุ่น WB22 (Memmert, Germany) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น Heraeus™ Primo™ (Thermo Scientific, Germany) นำสารละลายเจลาตินที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง รุ่น CoolSafe 55 (ScanLaf A/S, Lyngø, Denmark) ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะได้ตัวอย่างที่เป็นผงแห้งซึ่งจะใช้เป็นตัวควบคุม (Control)

#### 3.3.2.2 การประยุกต์ใช้อัลตราซาวด์ในการสกัดเจลาติน

นำหนังสือที่ปรับสภาพเรียบร้อยแล้วปริมาณ 40 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 320 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่องในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้อัลตราซาวด์ (Sonics, Model VC750, Sonica & Materials, Inc., Newtown, USA, 20 kHz  $\pm$  50 Hz, 750 W) ที่แอมพลิจูด 60% เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดโดยใช้ระยะเวลาและจังหวะการเปิด/ปิด คลื่นอัลตราซาวด์ (Period) ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.1 (และทำการสกัดด้วยความร้อนจนครบ 12 ชั่วโมง) นำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) นำสารละลายเจลาตินที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (CoolSafe 55, ScanLaf A/S) ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 สภาวะการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดเจลาติน

จังหวะการเปิด/ปิด (Periods)	จำนวนรอบ (ครั้ง) (Cycle)	เวลาในการให้คลื่นอัลตราซาวด์ (นาที) (Ultrasound treatment time)
เปิด 5 นาที ปิด 25 นาที 5/25	2	10
	4	20
	8	40
	12	60
เปิด 10 นาที ปิด 50 นาที 10/50	1	10
	2	20
	4	40
	6	60

### 3.4 การวิเคราะห์ผล

#### 3.4.1 ผลผลิตคิดเป็นปริมาณของแข็งทั้งหมด

ผลผลิตเจลาตินคำนวณจากน้ำหนักเริ่มต้น (น้ำหนักแห้ง) ของวัตถุดิบจากสมการ  
 ผลผลิตคิดเป็นปริมาณของแข็งทั้งหมด (%) =  $\frac{\text{น้ำหนักเจลาตินแห้ง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$

#### 3.4.2 การหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนและผลผลิตคิดเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

การหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนวิเคราะห์ตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963)  
 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนจะถูกคำนวณและแสดงในหน่วย มิลลิกรัม/กรัมตัวอย่าง

ผลผลิตเจลาตินคิดเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนคำนวณจากปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน  
 เริ่มต้นของหนังสือจากสมการ

$$\frac{\text{ผลผลิตเจลาตินคิดเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน}}{\text{ไฮดรอกซีโพรลีน (\%)}} = \frac{\text{ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในเจลาติน}}{\text{ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในหนังสือ}} \times 100$$

#### 3.4.3 การวัดค่าสี

นำเจลาตินแห้งมาละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยให้ความเข้มข้นของ  
 โปรตีนเท่ากับ 3.0% (w/v) จากนั้นนำสารละลายเจลาตินที่ได้แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส  
 เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้ขนาด (เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร; ความสูง 2.5 เซนติเมตร)  
 มาวัดค่าสีโดยใช้เครื่อง Hunter lab (Color Quest XE HunterLab, USA) ด้วยแสง D65 illuminant  
 และ 2° observer โดยค่าสีของแผ่นขาวมาตรฐานอยู่ที่  $L^*=94.03$ ,  $a^*=-0.89$  และ  $b^*=1.79$  เมื่อ  $L^*$ ;  
 ค่าความสว่าง,  $a^*$ ; ค่าสีแดง (+ คือ ค่าความเป็นสีแดง, - คือ ค่าความเป็นสีเขียว),  $b^*$ ; ค่าสีเหลือง (+ คือ  
 ค่าความเป็นสีเหลือง, - คือ ค่าความเป็นสีน้ำเงิน),  $\Delta E$ ; ค่าความแตกต่างของค่าสี

#### 3.4.4 การวัดค่าความขุ่น

นำเจลาตินแห้งมาละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยให้ความเข้มข้นของ  
 โปรตีนเท่ากับ 3.0% (w/v) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร โดยใช้  
 เครื่อง Spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.5 ความแข็งแรงเจล

นำเจลาตินแห้งมาละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยให้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 6.67% (w/v) จากนั้นนำสารละลายเจลาตินที่ได้แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้ขนาด (เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร; ความสูง 2.5 เซนติเมตร) นำมาทดสอบความแข็งแรงของเจลที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส รุ่น TA-XT2 (Stable Micro System, Surrey, UK) ที่โหลดเซลล์ขนาด 5 กิโลนิวตัน ซึ่งใช้ความเร็วของหัวเจาะที่ 1 มิลลิเมตร/วินาที และใช้หัวเจาะทรงกระบอก เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2.5 เซนติเมตร ซึ่งแรงสูงสุด (g) ถือว่าเป็นความแข็งแรงของเจล ที่ถูกบันทึกเมื่อระยะทางของการเจาะถึง 4 มิลลิเมตร

### 3.4.6 รูปแบบของโปรตีนโดย SDS-PAGE

นำเจลาตินแห้ง 1 กรัม มาละลายในสารละลาย SDS ที่ความเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำตัวอย่างเจลาตินที่ได้ไปผสมในบัฟเฟอร์ (0.5 M Tris HCl, pH 6.8 ที่มี SDS 4%, กลีเซอรอล 20%) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) และต้มเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีน 15 ไมโครกรัม โหลดลงใน polyacrylamide gel (4% (v/v) ของ Stacking gel และ 7.5% (v/v) ของ Resolving gels) และการอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA/gel หลังจากการอิเล็กโทรโฟรีซิสย้อมเจลด้วย 0.1% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 (v/v) ละลายในน้ำ, เมทานอล (15%) และกรดอะซิติก (5%) และล้างด้วย เมทานอล 30% (v/v) และกรดอะซิติก 10%

## 3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทดลองจะถูกวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's multiple range test<sup>[3]</sup>. จะทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Statistical Package for Social Science (SPSS).

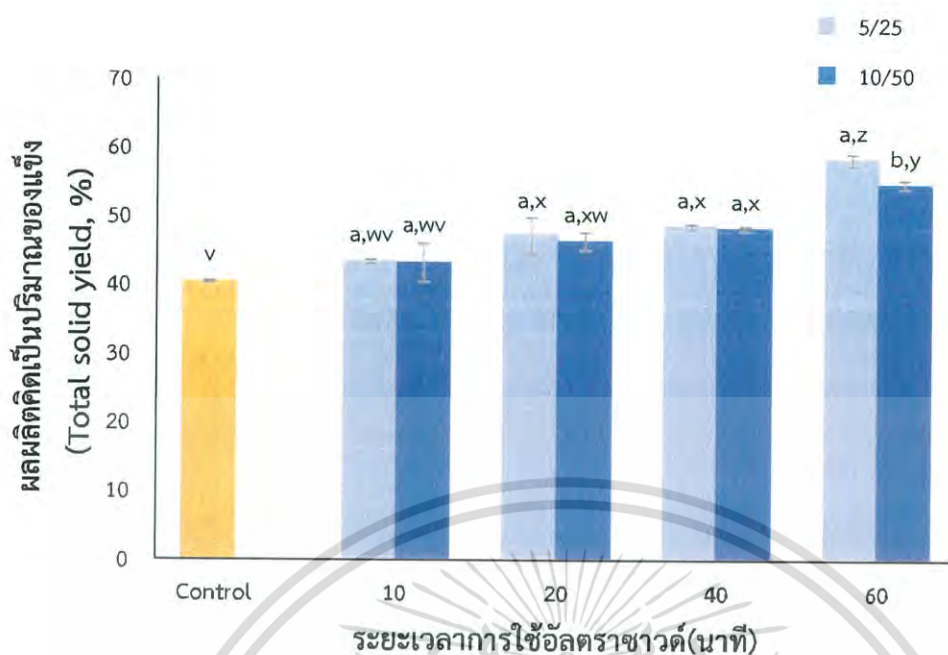
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 4.1 ผลผลิตเจลาตินคิดเป็นปริมาณของแข็ง

จากการทดลองใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือ (*R. tigrina*) โดยทำการศึกษาผลของการใช้อัลตราซาวด์ที่สภาวะแตกต่างกันคือ ระยะเวลา (10-60 นาที) และจังหวะของการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ (เปิด 5 นาที/พัก 25 นาที (5/25) และ เปิด 10 นาที/พัก 50 นาที (10/50)) ในระหว่างกระบวนการการสกัดที่ 55 องศาเซลเซียส (12 ชั่วโมง) พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือมีผลต่อปริมาณผลผลิตที่คิดเป็นปริมาณของแข็ง (Solid yield,%) ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ปริมาณผลผลิตเจลาตินหนังกบเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตเจลาตินที่ได้จากกระบวนการที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วย (Control) ปริมาณผลผลิตเจลาตินหนังกบเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดที่ระยะเวลา 20 นาที เป็นต้นไป ( $P < 0.05$ ) จากการใช้จังหวะการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ทั้ง 2 แบบที่ทำการทดลอง เมื่อทำการเปรียบเทียบผลผลิตเจลาตินที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่จังหวะการเปิด/ปิดแตกต่างกัน พบว่ากระบวนการอัลตราซาวด์ที่จังหวะ 5/25 และ 10/50 ให้ผลผลิตเจลาตินที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ที่ระยะเวลาการใช้อัลตราซาวด์ช่วยเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม ที่ระยะเวลาสูงสุดของการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วย (60 นาที) กระบวนการอัลตราซาวด์ที่จังหวะ 5/25 ให้ผลผลิตเจลาตินสูงกว่าผลผลิตจากกระบวนการอัลตราซาวด์ที่จังหวะ 10/50 ( $P < 0.05$ ) และเป็นกระบวนการที่ให้ผลผลิตเจลาตินสูงที่สุด (58.23%) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการสกัดที่ทำการศึกษาทั้งหมด การใช้อัลตราซาวด์กับวัตถุดิบเป็นการเพิ่มพลังงานในกระบวนการสกัด โดยช่วยทำให้เกิดการสั่นสะเทือนของของเหลวทำให้เกิดความร้อนและพลังงานอื่นๆ ซึ่งสามารถแทรกเข้าไปในวัตถุดิบได้ง่ายขึ้นช่วยให้กระบวนการสกัดมีประสิทธิภาพมากขึ้นและมีปริมาณผลผลิตเพิ่มมากขึ้น (Dhanalakshmi และคณะ, 2012) ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้เป็นไปตามการทดลองของ Tu และคณะ (2013) ที่ได้ทำการทดลองสกัดเจลาตินจากเกล็ดปลาตะเพียน (*Hypophthalmichthys nobilis*) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการการสกัดที่ 55 องศาเซลเซียส และที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (1-5 ชั่วโมง) พบว่าที่ระยะเวลาการสกัดที่เท่ากัน ปริมาณผลผลิตเจลาตินที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดให้ปริมาณผลผลิตที่มากกว่า และปริมาณผลผลิตจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด นอกจากนี้ Goula (2013) ได้รายงานผลของจังหวะการใช้อัลตราซาวด์ที่มีผลต่อการสกัดน้ำมันจากเมล็ดทับทิม พบว่าจังหวะการเปิด/ปิดของอัลตราซาวด์มีผลต่อกระบวนการสกัดและปริมาณผลผลิต คือ ปริมาณผลผลิตที่ได้จะลดลงเมื่ออัตราส่วนของจังหวะการเปิด/ปิดเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ผลผลิตเจลาตินคิดเป็นปริมาณของแข็งที่สกัดได้จากหนังกบเสือ (*R. tigerina*) โดยใช้ อัลตราไวโอเล็ตช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ

Control; ไม่ใช้อัลตราไวโอเล็ตช่วยในกระบวนการสกัด, 5/25; จังหวะในการเปิด/ปิดอัลตราไวโอเล็ต 5 นาที และปิด 25 นาที, 10/50; จังหวะในการเปิด/ปิดอัลตราไวโอเล็ต 10 นาที และปิด 50 นาที

\*a,b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างจังหวะการเปิดปิด ต่างกัน ที่ระยะเวลาในการใช้คลื่นอัลตราไวโอเล็ตเดียวกัน

\*z,y,x,w,v, แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

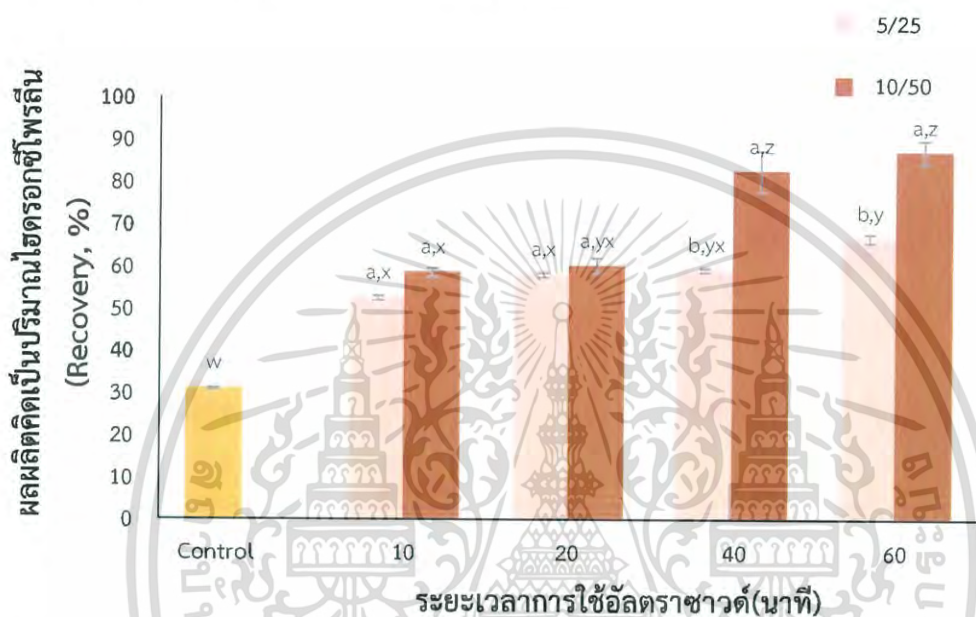
#### 4.2 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

ผลการทดลองใช้อัลตราไวโอเล็ตช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือ (*R. tigerina*) ที่ระยะเวลา 10-60 นาที และจังหวะของการเปิด/ปิดอัลตราไวโอเล็ต (5/25 และ 10/50) ต่างๆ ต่อปริมาณ ผลผลิตไฮดรอกซีโพรลีน (Recovery, %) แสดงไว้ในภาพที่ 4.2 พบว่าการใช้อัลตราไวโอเล็ตช่วยใน กระบวนการสกัดสามารถเพิ่มผลผลิตคิดเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (52.44-87.08%) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในทุกระยะเวลาและจังหวะของการเปิด/ปิดอัลตราไวโอเล็ตที่ทำการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่ใช้อัลตราไวโอเล็ต (Control) (30.87%) ปริมาณผลผลิตไฮดรอกซีโพรลีน เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการใช้อัลตราไวโอเล็ตช่วยในกระบวนการสกัดเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิต ไฮดรอกซีโพรลีนที่ได้จากการใช้อัลตราไวโอเล็ตช่วยในกระบวนการสกัดที่ระยะเวลาเท่ากันแต่จังหวะ การเปิด/ปิดต่างกัน พบว่าจังหวะ 10/50 ให้ผลผลิตไฮดรอกซีโพรลีนที่สูงกว่าจังหวะ 5/25 โดยเฉพาะที่ ระยะเวลาการใช้อัลตราไวโอเล็ตที่ 40 และ 60 นาที ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการ ทดลองของ Pan และคณะ (2010) ซึ่งทำการศึกษากการสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดโดยใช้อัลตราไวโอเล็ตช่วย ในกระบวนการการสกัด และพบว่าการใช้อัลตราไวโอเล็ตสามารถช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตไฮดรอกซีโพรลีน (%Recovery) ได้ และเมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาการใช้อัลตราไวโอเล็ตช่วยในกระบวนการการสกัดสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในพิธีการศึกษาคณะเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเห็นแก่ประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มปริมาณผลผลิตได้ จากผลของการสั้นสะท้อนของคลื่นอัลตราซาวด์ช่วยทำให้เกิดโพรงอากาศในสารละลายที่ใช้ในการสกัดเมื่อโพรงอากาศเกิดการแตกออกจะทำให้เกิดพลังงานแกว้ตฤติบและยังช่วยให้พลังงานความร้อนที่ใช้ในการสกัดสามารถเข้าถึงวัตถุบได้ง่่ายขึ้นทำให้กระบวนการการสกัดมีประสิทธิภพตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปยังวัตถุบได้ดีขึ้น (Dhanalakshmi และคณะ, 2012) พบว่าที่ระยะเวลาการสกัดเท่ากัน การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่ช่วงความถี่ของจ้งหะการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ที่น้อยกว่าเป็นการให้พลังงานอย่างต่อเนื่องมากกว่าการใช้อัลตราซาวด์ที่จ้งหะการเปิด/ปิดแบบถี่กว่าทำให้ไฮดรอกซีโพรลีนหลุดออกมามากกว่า



ภาพที่ 4.2 ผลผลิตคิดเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่สกัดได้จากหน้งกบเสื่อ (*R. tigerina*) โดยใช้ อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ

Control; ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด, 5/25; จ้งหะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ 5 นาที และปิด 25 นาที, 10/50; จ้งหะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ 10 นาที และปิด 50 นาที

\*a,b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างจ้งหะการเปิดปิดต่างกัน แต่ที่ระยะเวลาในการใช้คลื่นอัลตราซาวด์เดียวกัน

\*z,y,x,w,v, แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

จากตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของเจลาตินที่สกัดได้จากหน้งกบเสื่อ (*R. tigerina*) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ พบว่าเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด (Control) มีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนสูงที่สุด ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดส่งผลให้เจลาตินหน้งกบที่ได้มีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนต่ำลง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์ในกระบวนการสกัด แต่อย่างไรก็ตาม การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่จ้งหะการเปิด/ปิดต่างกัน ไม่มีผลต่อปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในเจลาตินหน้งกบเสื่อที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ที่ระยะเวลาการใช้อัลตราซาวด์เท่ากัน ผลการทดลองที่ได้บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของตัวอย่างเจลาตินหน้งกบที่ลดลงเมื่อใช้อัลตราซาวด์ช่วย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกระบวนการสกัด ถึงแม้ว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการผลิตจะช่วยเพิ่มผลผลิตคิดเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Recovery, %) (ภาพที่ 4.2) แต่ขณะเดียวกันผลผลิตคิดเป็นปริมาณของแข็ง (Solid Yield, %) (ภาพที่ 4.1) ก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยพลังงานจากอัลตราซาวด์ที่ให้ในระบบ ได้เพิ่มความสามารถในการสกัดโปรตีนเจลาตินและอาจมีผลต่อการสกัดองค์ประกอบอื่นๆ จากหนังกบที่ไม่ใช่โปรตีนเจลาตินหลุดออกมาอีกด้วย

**ตารางที่ 4.1** ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของเจลาตินที่สกัดได้จากหนังกบเสือ (*R. tigrina*) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ

ตัวอย่าง	มิลลิกรัมไฮดรอกซีโพรลีน/มิลลิกรัมของแข็ง	
Control	95.78±1.41 <sup>a</sup>	
5/25	10	91.84±1.35 <sup>b</sup>
	20	86.79±2.85 <sup>c</sup>
	40	80.82±0.74 <sup>d</sup>
10/50	60	77.23±2.77 <sup>e</sup>
	10	89.73±1.59 <sup>bc</sup>
	20	88.47±2.72 <sup>c</sup>
	40	80.23±0.85 <sup>de</sup>
60	78.25±0.31 <sup>de</sup>	

\*ค่าที่แสดงในตารางจะเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Control; ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด, 5/25; จังหวะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ที่ 5 นาที และ ปิด 25 นาที, 10/50; จังหวะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ที่ 10 นาทีและปิด 50 นาที, 10-60; ระยะเวลาในการใช้อัลตราซาวด์ (นาที)

\*a,b,c,d... แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

### 4.3 ค่าสีและความขุ่นของเจลาติน

จากการวิเคราะห์ค่าสีของเจลาตินหนังกบเสือที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการผลิตเปรียบเทียบกับเจลาตินทางการค้า (เจลาตินวัว (B) และเจลาตินปลา (F)) ได้ผลลัพธ์ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งค่าสีของเจลาตินแสดงเป็นค่า  $L^*$  คือ ค่าความสว่าง, ค่า  $a^*$  คือ ค่าสีแดง (+ ค่าความเป็นสีแดง, - คือ ค่าความเป็นสีเขียว), ค่า  $b^*$  คือ ค่าสีเหลือง (+ คือ ค่าความเป็นสีเหลือง, - คือ ค่าความเป็นสีน้ำเงิน) และค่าความแตกต่างของค่าสี ( $\Delta E^*$ ) ซึ่งแสดงความแตกต่างของตัวอย่างเจลาตินเปรียบเทียบกับสีขาวมาตรฐาน พบว่า ระยะเวลาและจังหวะการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ที่สภาวะต่างๆ ให้เจลาตินหนังกบที่ค่าสีแตกต่างกัน เจลาตินที่สกัดได้จากหนังกบมีค่าความสว่าง ( $L^*$ ) สูงกว่าเจลาตินทางการค้าและการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินทำให้เจลาตินที่ได้มีค่าความสว่างที่สูงขึ้น

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามการเพิ่มขึ้นของระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์ ในทั้งสองจังหวะการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ (5/25 และ 10/50) ที่ได้ทำการทดลอง นอกจากนี้ค่าความเป็นสีเขียวของเจลาตินหนังกบที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดเพิ่มขึ้น ตามค่า  $a^*$  ที่ลดลง และค่าความเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้นตามค่า  $b^*$  ที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกันกับความแตกต่างของค่าสี ( $\Delta E^*$ ) ของเจลาตินที่ลดลง ตามการเพิ่มขึ้นของระยะเวลาที่ใช้ อัลตราซาวด์ ในทั้งสองจังหวะการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ที่ได้ทำการทดลอง แสดงให้เห็นว่า เจลาตินหนังกบที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดมีความใกล้เคียงกับแผ่นสีขาวมาตรฐาน สอดคล้องกับ งานวิจัยของ Ali และคณะ (2018) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและโมเลกุลของเจลาตินจาก หนังกปลาอีสก (*Probarbus jullieni*) ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดและอัลตราซาวด์ พบว่าการใช้อัลตราซาวด์มีผลต่อค่าความสว่างที่สูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันการใช้ระยะเวลาในการสกัดเพิ่มมากขึ้นค่าความเป็นสีเหลือง  $b^*$  จะเพิ่มสูงขึ้นด้วย จากการเกิดกลุ่มของกรดอะมิโนอิสระส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา สีน้ำตาลทำให้ค่าสีเหลือง  $b^*$  เพิ่มขึ้น และจากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดร่วมกับเอนไซม์ต่อ คุณสมบัติเคมีกายภาพในโมเลกุลของเจลาตินทำให้ค่าความสว่าง ( $L^*$ ) เพิ่มสูงขึ้นที่ระยะเวลาในการสกัดสั้นลง แต่จะมีค่าสีเหลือง  $b^*$  เพิ่มสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาการสกัดโดยใช้อัลตราซาวด์นานขึ้น (Ahmad และ คณะ, 2018) ในขณะเดียวกัน Widyasar และ Rawdkuen (2014) อธิบายว่าผลของการสกัดและลักษณะของเจลาตินจากเท้าไก่โดยการใช้กรดและอัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด เจลาตินที่สกัดได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยมีค่าความสว่างสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเจลาตินที่สกัดได้จากการใช้กรดและเจลาตินทางการค้า

ผลการตรวจวัดค่าความขุ่นของเจลาตินหนังกบ (ตารางที่ 4.2) สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าสี เนื่องจากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือ ค่าความขุ่นเป็นคุณสมบัติหนึ่งของเจลาตินซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพของเจลาตินที่สกัดได้ ซึ่งเจลาตินที่ดีควรมีค่าความขุ่นต่ำ (Ut และ Jongjareonrak (2012) จากผลการทดลองพบว่า เจลาตินทางการค้าที่มาจากวัว (B) และปลา (F) มีค่าความขุ่นน้อยกว่าเจลาตินจากหนังกบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และค่าความขุ่นของเจลาตินหนังกบที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์ ( $P < 0.05$ ) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเจลาตินที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ที่จังหวะเปิด/ปิด 10/50 ที่แสดงค่าความขุ่นสูงกว่าเจลาตินที่ได้จาก 5/25 ( $P < 0.05$ ) ที่ระยะเวลาการใช้อัลตราซาวด์เท่ากัน พลังงานการสั่นสะเทือนจากคลื่นอัลตราซาวด์ที่ใช้ในการสกัดสามารถถึงส่วนที่ไม่ใช่เจลาติน เช่น เม็ดสี ไขมัน โปรตีนที่ไม่ใช่เจลาติน และของแข็งที่ไม่ใช่โปรตีนต่างๆ ที่อยู่ในหนังกบหลุดออกมาด้วย และมีผลต่อค่าสีและค่าความขุ่นของเจลาตินที่สกัดได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการลดลงของค่าความบริสุทธิ์ของเจลาตินคิดเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของเจลาตินเมื่อใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด (ตารางที่ 4.1) Kittiphattanabawon และคณะ (2016) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังกปลาทราย พบว่าเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดสูงขึ้น จะเกิดการรวมตัวของโปรตีนทำให้มีความขุ่นเพิ่มขึ้น Jung และคณะ (2018) ศึกษาการพัฒนากระบวนการผลิตคอลลาเจน และคุณสมบัติทางชีวเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังกปลาชีกเดียว (*Paralichthys olivaceus*) พบว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความถี่ (amplitude) สูงขึ้นมีผลต่อค่าความขุ่นของคอลลาเจนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เมื่อนำอัลตราซาวด์มาประยุกต์ใช้ในการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือทำให้มีค่าความขุ่นสูงขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าสีและค่าความขุ่นของเจลาตินจากหนังกบเสือ (*R. tigrina*) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ

ตัวอย่าง	ค่าสี				ความขุ่น	
	L*	a*	b*	$\Delta E^*$		
B	28.26±0.24 <sup>j</sup>	-0.13±0.06 <sup>b</sup>	-0.37±0.04 <sup>c</sup>	65.80±0.24 <sup>a</sup>	0.08±0.001 <sup>j</sup>	
F	28.92±0.23 <sup>j</sup>	0.09±0.05 <sup>a</sup>	-1.60±0.07 <sup>d</sup>	65.20±0.23 <sup>a</sup>	0.05±0.001 <sup>j</sup>	
Control	32.91±1.09 <sup>i</sup>	-0.75±0.19 <sup>c</sup>	-4.58±0.51 <sup>f</sup>	61.44±1.03 <sup>b</sup>	1.27±0.004 <sup>i</sup>	
5/25	10	47.36±1.21 <sup>f</sup>	-2.78±0.05 <sup>d</sup>	-3.37±0.06 <sup>e</sup>	46.98±1.21 <sup>e</sup>	2.88±0.01 <sup>h</sup>
	20	39.71±1.00 <sup>h</sup>	-2.73±0.1 <sup>d</sup>	-3.25±0.22 <sup>e</sup>	54.58±0.98 <sup>c</sup>	3.44±0.022 <sup>g</sup>
	40	64.42±0.42 <sup>b</sup>	-3.83±0.06 <sup>fg</sup>	6.48±0.42 <sup>a</sup>	30.12±0.34 <sup>i</sup>	11.47±0.021 <sup>c</sup>
10/50	60	61.95±0.07 <sup>c</sup>	-3.77±0.01 <sup>f</sup>	3.72±0.03 <sup>b</sup>	32.27±0.27 <sup>h</sup>	9.56±0.005 <sup>d</sup>
	10	43.58±1.36 <sup>g</sup>	-3.17±0.08 <sup>e</sup>	-5.47±0.03 <sup>g</sup>	51.02±1.34 <sup>d</sup>	4.78±0.040 <sup>f</sup>
	20	49.76±1.18 <sup>e</sup>	-4.19±0.23 <sup>h</sup>	-0.23±0.11 <sup>c</sup>	44.43±1.17 <sup>f</sup>	6.28±0.016 <sup>e</sup>
	40	57.97±0.36 <sup>d</sup>	-3.92±0.06 <sup>g</sup>	6.31±0.01 <sup>a</sup>	36.47±0.36 <sup>g</sup>	12.24±0.035 <sup>b</sup>
60	69.04±0.36 <sup>a</sup>	-3.76±0.02 <sup>f</sup>	3.71±0.04 <sup>b</sup>	25.23±0.35 <sup>j</sup>	12.76±0.030 <sup>a</sup>	

\*ค่าที่แสดงในตารางจะเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

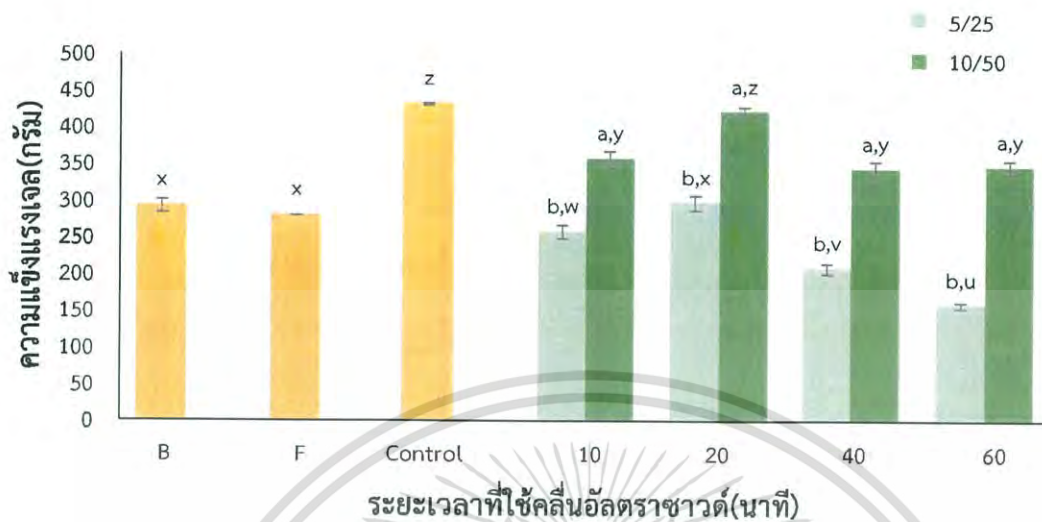
B; เจลาตินทางการค้าจากวัว, F; เจลาตินทางการค้าจากปลา, Control; ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด, 5/25; จังหวะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ที่ 5 นาทีและปิด 25 นาที, 10/50; จังหวะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ที่ 10 นาทีและปิด 50 นาที, 10-60; ระยะเวลาในการใช้อัลตราซาวด์ (นาที)

\*a,b,c,d... แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.4 ความแข็งแรงเจล

จากการวิเคราะห์ค่าความแข็งแรงเจลของเจลาตินหนังกบเสือที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการผลิต เปรียบเทียบกับเจลาตินทางการค้า (เจลาตินวัว (B) และเจลาตินปลา (F)) ได้ผลลัพธ์ดังแสดงในภาพที่ 4.3 เจลาตินจากหนังกบเสือ (Control) มีค่าความแข็งแรงเจลสูงกว่าเจลาตินทางการค้า (เจลาตินวัว (B) และเจลาตินปลา (F)) ( $P < 0.05$ ) และการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดมีผลต่อการลดลงของความแข็งแรงเจลของเจลาตินที่ได้ ในขณะที่เดียวกันการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่จังหวะการเปิด/ปิดที่แตกต่างกันให้เจลาตินที่มีค่าความแข็งแรงเจลที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกันที่ใช้ระยะเวลาในการให้อัลตราซาวด์เท่ากัน แต่อย่างไรก็ตามที่จังหวะการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ 10/50 ให้ค่าความแข็งแรงเจลสูงกว่าที่ 5/25 ( $P < 0.05$ ) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่จังหวะการเปิด/ปิด 10/50 เป็นเวลา 20 นาที (420.49 กรัม) มีค่าความแข็งแรงเจลสูงเทียบเท่ากับวิธีการที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วย (Control) (431.42 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) เนื่องจากการใช้อัลตราซาวด์กับวัตถุดิบเป็นการเพิ่มพลังงานในกระบวนการการสกัด ซึ่งช่วยทำให้เกิดการสั่นสะเทือนของของเหลวทำให้เกิดความร้อนและพลังงานอื่นๆ จะสามารถแทรกเข้าไปในวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น โดยพลังงานความร้อนที่เกิดขึ้นจะไปทำลายส่วนที่เป็นพันธะเปปไทด์ของโปรตีนสายยาว (สายโซ่  $\alpha$   $\beta$  และ  $\gamma$ ) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเจลาตินให้เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบโปรตีนของเจลาตินหนังกบโดยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.4)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ความแข็งแรงเจลของเจลลาตินจากหนังกบเสือ (*R. tigerina*) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สถานะต่างๆ

B; เจลาตินทางการค้าจากวัว, F; เจลาตินทางการค้าจากปลา, Control; ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด, 5/25; จังหวะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ 5 นาทีและปิด 25 นาที, 10/50; จังหวะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ 10 นาทีและปิด 50 นาที

\*a,b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างจังหวะการเปิดปิดต่างกัน แต่ที่ระยะเวลาในการใช้คลื่นอัลตราซาวด์เดียวกัน

\*z,y,x,w,v, แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อคุณสมบัติในการก่อตัวของเจลเจลาตินเกิดเป็นโครงสร้างที่ไม่แข็งแรงและมีค่าความแข็งแรงเจลลดลงได้ (Ali และคณะ, 2014) แต่อย่างไรก็ตามการเกิดพันธะเปปไทด์สายสั้นอาจจะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างโครงข่ายของเปปไทด์สายยาวและเติมเต็มช่องว่างในโครงข่ายเจลทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นเจลที่แข็งแรงขึ้น (Karnjanapartum และคณะ, 2017) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ahmad และ Benjakul (2011) ทำการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของเจลาตินจากหนังปลาวัว (*Aluterus monoceros*) ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดและระยะเวลาในการสกัดต่างๆ พบว่าค่าความแข็งแรงเจลเจลาตินที่สกัดได้จะลดลงเมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนและอัตราส่วนของสายโซ่  $\alpha$  และ  $\beta$  ที่มีอยู่ในเจลาติน ไม่ใช่ปัจจัยหลักเพียงอย่างเดียวในการขึ้นรูปของเจลเจลาตินแต่องค์ประกอบของโปรตีนเจลาตินจะถูกพัฒนาขึ้นเพื่อสร้างโครงข่ายที่แข็งแรงสำหรับการเกิดเจลซึ่งตำแหน่งของกรดอะมิโนของเปปไทด์สายโซ่  $\alpha$  ที่เป็นอิสระจะเกิดการเชื่อมข้ามทำให้เกิดการควบแน่นหรือการรวมตัวกันเกิดเจลได้ดีขึ้นและคุณสมบัติของการก่อเจลได้รับอิทธิพลมาจากองค์ประกอบของไฮดรอกซีโพรลีนในตัวอย่างที่สกัดได้ (Jongjareonrak และคณะ, 2006) ในขณะที่เดียวกัน Nhat และคณะ (2016) อธิบายผลของการประยุกต์ใช้อัลตราซาวด์ร่วมกับด่างและกรดในการปรับสภาพหนังปลาทูน่าที่แอมพลิฟิแคชัน 80% คาบการเคลื่อนที่ 0.8 s/s และระยะเวลา 20-35 นาที

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า การใช้อัลตราซาวด์ช่วยที่ระยะเวลา 30 นาที มีค่าความแข็งแรงเจลสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระยะเวลาต่างๆ และจะมีค่าลดลง เมื่อระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์เพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากการใช้กรดสามารถทำลายพันธะเปปไทด์ของคอลลาเจนทำให้เกิดการแยกส่วนเป็นชิ้นเล็กๆ Tu และคณะ (2013) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของเจลลาตินที่สกัดได้จากเกล็ดปลาตะเพียนโดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด พบว่าเจลลาตินที่สกัดได้จากวิธีการที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วย (Control) ให้ความแข็งแรงเจลที่สูงที่สุด และการสกัดแบบใช้อัลตราซาวด์ช่วยที่ระยะเวลานานขึ้นจะส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลลดลง ดังนั้นจากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า อัลตราซาวด์สามารถใช้เป็นกระบวนการช่วยในการเพิ่มผลผลิตของเจลลาตินที่สกัดได้จากหนังกบเสือโดยอัลตราซาวด์ที่ใช้ในกระบวนการสกัดที่จังหวะการเปิด/ปิดและระยะเวลามีผลต่อความแข็งแรงเจล ซึ่งจังหวะการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ 10/50 ให้เจลลาตินที่มีความแข็งแรงเจลดีกว่า 5/25

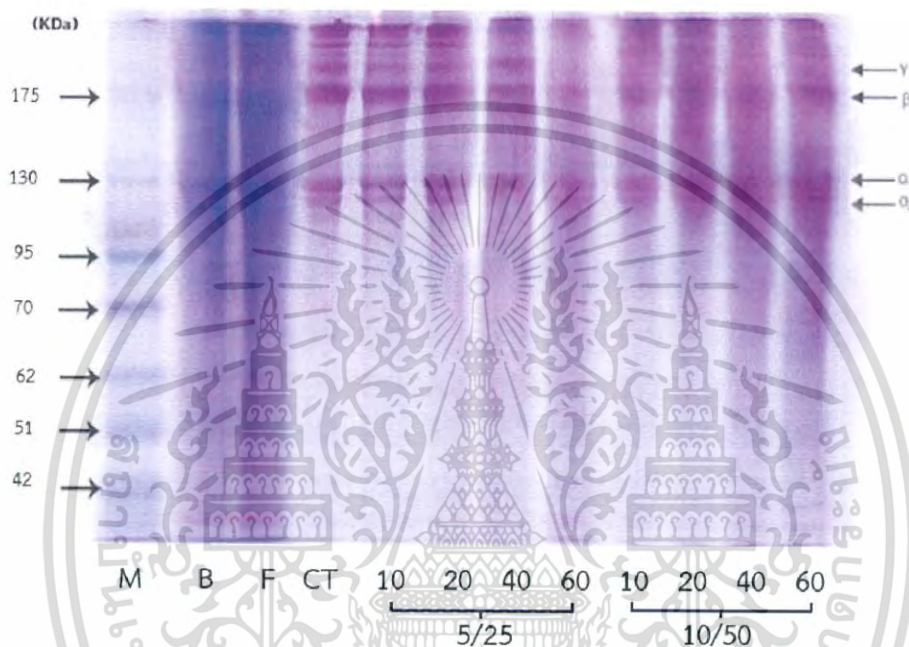
#### 4.5 รูปแบบโปรตีนของเจลลาติน

จากการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโปรตีนเจลลาตินของหนังกบเสือ (*R. tigrina*) ที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด เปรียบเทียบกับเจลลาตินทางการค้า (เจลลาตินวัว (B) และเจลลาตินปลา (F)) ผลลัพธ์แสดงในรูปที่ 4.4 เจลาตินหนังกบ (CT) ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 126,000-115,000 ดาลตัน 130,00 ดาลตัน และ 175,000 ดาลตัน เป็นองค์ประกอบหลักแสดงถึงสายแอลฟา ( $\alpha_1$  และ  $\alpha_2$ ) สายเบต้า ( $\beta$ ) (โครงสร้างสองสาย) และสายแกมมา ( $\gamma$ ) (โครงสร้างสามสาย) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบโปรตีนเจลลาตินจากหนังกบจากงานของ Karnjanapartum และคณะ (2017) ในขณะเดียวกันการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดส่งผลให้เกิดโปรตีนสายสั้นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า ( $\alpha_2$ ) 115,000 ดาลตัน เพิ่มขึ้น พร้อมกับการลดลงของแถบโปรตีน  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_1$  และ  $\alpha_2$  ตามการเพิ่มขึ้นของระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดในทั้ง 2 จังหวะการเปิด/ปิด ที่ทำการทดลอง เมื่อทำการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนเจลลาตินหนังกบที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่ระยะเวลาการใช้อัลตราซาวด์เดียวกัน พบว่าเจลลาตินที่ได้จากการใช้จังหวะเปิด/ปิด 5/25 เกิดการเสียสภาพของโปรตีนน้อยกว่าการใช้จังหวะเปิด/ปิด 10/50 อย่างชัดเจน โดยสังเกตได้จากการเกิด Smear band ที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กที่เข้มกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ที่ระยะเวลาการใช้อัลตราซาวด์สูงสุด (60 นาที) เกิดแถบโปรตีนขนาดเล็กที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 42 กิโลดาลตัน การใช้อัลตราซาวด์กับวัตถุดิบเป็นการเพิ่มพลังงานในกระบวนการสกัด โดยช่วยทำให้เกิดการสั่นสะเทือนของของเหลวทำให้เกิดความร้อน และเกิดการแตกออกของโพรงอากาศ (acoustic cavitation) ทำให้พลังงานสามารถแทรกเข้าไปในวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น (Dhanalakshmi และคณะ, 2012) โดยพลังงานความร้อนที่เกิดขึ้นจะไปทำลายส่วนที่เป็นพันธะเปปไทด์ของโปรตีนสายยาว  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_1$  และ  $\alpha_2$  ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเจลลาตินให้เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นลง (Tu และคณะ, 2013) แต่อย่างไรก็ตาม เจลาตินที่ได้จากจังหวะการเปิด/ปิด 10/50 ให้ค่าความแข็งแรงเจลสูงกว่า 5/25 (ภาพที่ 4.3) ค่าความแข็งแรงของเจลลาตินขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความบริสุทธิ์ของเจลลาติน ขนาดโมเลกุล การจัดเรียงตัว ความยาวของสายเปปไทด์ และกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (Giménez และคณะ 2005) จากการศึกษาเจลลาตินที่ได้จากหนังกบเสือที่จังหวะการเปิด/ปิด 10/50 มีค่าความบริสุทธิ์แสดงเป็นปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (ตารางที่ 4.1) ไม่แตกต่างกันกับที่จังหวะการเปิด/ปิด 5/25 เพราะฉะนั้นความแข็งแรงเจลที่แตกต่างกันของเจลลาตินหนังกบเสือที่เกิดจากรูปแบบโปรตีนเจลลาตินที่เป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกัน Ahmad และ Benjakul (2011) ศึกษาคุณสมบัติของเจลลาตินที่ได้จากหนังปลาวัว (*Aluterus monoceros*) ที่ได้รับอิทธิพลจากการปรับสภาพด้วยกรดและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลาในการสกัด พบว่า ความแข็งแรงเจลเจลาตินที่เกิดขึ้นมาจากหลายปัจจัย เช่น การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในโปรตีน และการจับกันภายในของโครงข่ายโปรตีนเจลาตินซึ่งสามารถช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงเจลได้ นอกจากนี้การเกิดไฮโดรไลซิสของโปรตีนที่เกิดเป็นสายโซ่แอลฟา และ Oligopeptide ที่เป็นอิสระจะถูกปล่อยออกมาและช่วยทำให้เกิดการ cross-links โดยพันธะไฮโดรเจนอยู่ภายในโครงข่ายเจลาตินช่วยทำให้เจลาตินมีความแข็งแรงมากขึ้น จากการศึกษาการประยุกต์ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดมีผลต่อรูปแบบโปรตีนเจลาตินที่ได้ ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติของเจลาติน โดยเฉพาะด้านความแข็งแรงเจล



ภาพที่ 4.4 รูปแบบโปรตีนของเจลาตินจากหนังกบเสือ (*R. tigrina*) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะที่ต่างๆ

M; โปรตีนมาตรฐาน, B; เจลาตินทางการค้าจากวัว, F; เจลาตินทางการค้าจากปลา, CT; เจลาตินจากหนังกบที่ไม่ได้ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด, 5/25; เจลาตินหนังกบที่จิ้งหะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ 5 นาทีและปิด 25 นาที, 10/50; เจลาตินหนังกบที่จิ้งหะในการเปิดคลื่นอัลตราซาวด์ 10 นาที และปิด 50 นาที, 10-60; ระยะเวลา (นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผล

อัลตราซาวด์สามารถใช้เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือ (*Rana tigerina*) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ระยะเวลาและจังหวะการเปิด/ปิดอัลตราซาวด์ที่ใช้เป็นกระบวนการช่วยมีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของเจลาตินหนังกบที่ได้ ทั้งค่าสี ความขุ่น และความแข็งแรงเจล กระบวนการช่วยสกัดโดยอัลตราซาวด์สามารถเพิ่มผลผลิตเจลาติน แต่ทำให้ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในเจลาตินที่ได้ลดลงซึ่งจะสัมพันธ์กับค่าสีและค่าความขุ่นที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดเป็นสาเหตุให้เกิดเปปไทด์สายสั้น ซึ่งมีผลกระทบต่อความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากกบเสือที่ได้ ดังนั้น อัลตราซาวด์ถือเป็นเทคนิคทางเลือกที่น่าสนใจในการช่วยสกัดเจลาตินจากหนังกบเสือและจากวัตถุดิบอื่นๆที่ใกล้เคียง โดยต้องทำการศึกษาสภาวะการใช้งานให้เหมาะสมต่อแหล่งโปรตีนคอลลาเจนแต่ละชนิด

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองครั้งนี้ ได้ศึกษาการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่ระยะเวลาและจังหวะการเปิดปิดต่างๆ โดยเจลาตินที่ได้มีค่าความแข็งแรงเจลที่ดีเทียบเคียงกับเจลาตินทางการค้า แต่การพัฒนา ค่าสีและความขุ่น ยังต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป
2. ในการทดลองการหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนสารที่ใช้ในการทดสอบจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเมื่อโดนแสง จึงต้องทำการเก็บสารที่เตรียมได้ในที่มืดหรือที่ปราศจากแสง และจะต้องทำการใส่สารตามลำดับ
3. อุณหภูมิของตัวอย่างมีผลต่อความแข็งแรงเจล ดังนั้นในระหว่างการทดสอบความแข็งแรงเจล ต้องควบคุมอุณหภูมิตัวอย่าง ( $10 \pm 3$  องศาเซลเซียส) ให้เหมือนกันในทุกตัวอย่าง

## บรรณานุกรม

- ฐิตินันท์ ศรีทัน ธนัชชา ทองประसार และศศิธร อินสว่าง. 2554. การสกัดเจลาตินจากเนื้อเยื่อหนังกระเพาะไก่. ปรินญาบัณฑิต. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธัญลักษณ์ เกิดบัวทอง. 2556. การปรับปรุงสมบัติการเกิดเจลของเจลาตินจากหนังปลาหูนาเพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์เลี้ยง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์. ม.ป.ป. Ultrasonic/อัลตราโซนิคส์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0535/ultrasonic>.
- สินีนาด สุขไกว. 2555. การผลิตเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาสำหรับการพัฒนาเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Abedinia, A., Ariffin, F., Huda, N. and Nafchi, A. M. 2017. Extraction and characterization of gelatin from the feet of pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*) as affected by acid, alkaline, and enzyme pretreatment. International Journal of Biological Macromolecules. 99: 586-594.
- Ahmad, M. and Benjakul, S. (2011). Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. Food Hydrocolloids. 25: 381-388.
- Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T. and Agustini T. W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. Food Hydrocolloids. 28: 128-199.
- Ahmad, T., Ismail, A., Ahmad, S. A., Khalil, K.A., Awad, E. A., Leo, T. K., Imlan, J.C. and Sazili, A.Q. 2018. Characterization of gelatin from bovine skin extracted using ultrasound subsequent to bromelain pretreatment. Food Hydrocolloids. 80: 264-273.
- Ahmad, T., Ismail, A., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Leo, T. K., Awad, E. A., Imlan, J. C. and Sazili, A.Q. 2018. Effects of ultrasound assisted extraction in conjugation with aid of actinidin on the molecular and physicochemical properties of bovine hide gelatin. Molecules. 23: 730.
- Ali, M. M., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2018. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication. Process Biochemistry. 66: 237-224.
- Ali, M. M., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2018. Physicochemical and molecular properties of gelatin from skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as influenced by acid pretreatment and prior-ultrasound. Food Hydrocolloids. 82: 164-172.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ali, M. M., Benjakul, S., Prodpran, T. and Maqsood, S. (2016). Characteristics and gel properties of gelatin from goat skin as affected by extraction conditions. *Journal of Food Preservation*. 1745-4549.
- Altaf, U., Rouf, A., Kanojia, V., Ayaz, Q. and Zargar, I. 2018. Ultrasound treatment: a novel processing technique for food preservation. *The Pharma Innovation Journal*. 7: 234-241.
- Arzeni, C., Martinez, K., Zema, P., Arias, A., Pe'rez, O.E. and Pilosof, A. M. R. 2012. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*. 108(3): 463-472.
- Benjakul, S., Oungbho, K., Visessanguan, W., Thiansilakul, Y. and Roytrakul, S. 2009. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. *Food Chemistry*. 116: 445-451.
- Bergman, I. and Loxley, R. 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Analytical Chemistry*. 35(12): 1961-1965.
- Butz, P. and Tauscher, B. 2002. Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research international*. 35(2): 279-284.
- Cole, B., 2000. Gelatin. In *Encyclopedia of Food Science and Technology 2*, (Francis. F. J., ed.). Wiley. New York. 1183-1188.
- Daszak, P., Schloegel, L.L., Louise, M., Cronin, A., Pokras, M., Smith, K. and Picco, A. 2006. The global trade in amphibians: Summary interim report of a CCM study in report of the consortium for conservation medicine. New York: Consortium for Conservation Medicine.
- Dhanalakshmi, N. P., Nagarajan, R. Sivagaminathan, N. and Prasad, B. V. S. S. S. 2012. Acoustic enhancement of heat transfer in furnace tubes. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 59: 36-42.
- Ercan, S. S. and Soysal, C. 2013. Use of ultrasound in food preservation. *Natural Science*. 5: 5-13.
- Giménez, B., Turnay, J., Lizarbe, M. A., Montero, P. and Gómez-Guillén, M. C. 2005. Use of Lactic acid for extraction of fish skin gelatin. *Food Hydrocolloids*. 19(6): 941-950.
- Goule, A. M. 2012. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil-Kinetic Modeling. *Journal of Food Engineering*.
- Harris, P., 1990. *Food gel: gelatin*. Elsevier Applied Science, London. 476p.
- Huang, T., Tu, Z.-c., Shangguan, X., Wang, H., Zhang, L., and Sha, X.-m. 2017. Rheological and structural properties of fish scales gelatin: Effects of conventional and ultrasound-assisted extraction, *International Journal of Food Properties*. 20(2): 1210-1220.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Tanaka, M. 2006. Skin gelat from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*. 20: 1216e1222.
- Jongjareonrak, A., Rawdkuen, S., Chaija, M., Benjakul, S., Osako, k. and Tanaka, M. (2010). Chemical composition and characterization of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*). *LWT - Food Science and Technology*. 43: 161-165.
- Jung, S.K., Kim, Y.H., Kim, Y.E., Song, K.-M. and Lee, N.H. 2018. Development of industrial ultrasound system for mass production of collagen and biochemical characteristics of extracted collagen. *Food and Bioproducts Processing*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.04.001>.
- Karnjanapratum, S., Sinthusamran, S., Sae-leaw, T., Benjakul, S. and Kishimura, H. 2017. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of Asian bullfrog (*Rana tigerina*). *Food Biophysics*. 12(3): 289-298.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Sinthusamran, S. and Kishimura, H. 2016. Gelatin from clown featherback skin: extraction conditions. *LWT - Food Science and Technology*. 66: 186-192.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Shahidi. 2010. Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction conditions. *Food Hydrocolloids*. 24:164-171.
- Knopp, K. and Bagemihl, F. 1996. Theory of functions parts I and II. [Online]. Available : <https://th.wikipedia.org/wiki/amplitude>.
- Mason, T. J. , Paniwnyk, L. , and Lorimer, J. P. 1996. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3 : 253-260.
- Monsur, H. A., Jaswir, I., Salleh, H. M. and Alkahtani, H. A. 2014. Effects of pretreatment on properties of gelatin from perch (*Lates Niloticus*) skin. *International Journal of Food Properties*. 17(6): 1224-1236.
- Nhat, D. M. and Hien, C. T. 2016. Effect of ultrasound on pretreatment of tuna skin for gelatin production. *Journal of Science and Technology*. 54(4A): 55-62.
- Oduntan, O. O., Soage, J. A. and Jenyo-Oni, A. 2012. Comparison of edible frog (*Ranaesculenta*) and other bush meat types: Proximate composition, social status and acceptability. *Journal of Environmental Research and Management*. 3(7): 124-128.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Pan, Y., Dong, S., Hao, Y., Zhou, Y., Ren, X., Wang, J. and Chu, T. 2010. Ultrasonic-assisted extraction process of crude polysaccharides from Yunzhi mushroom and its effect on hydroxyproline and glycosaminoglycan levels. *Carbohydrate Polymers*, 81(1): 93–96.
- Pariyanonth, P. and Daorerk, V. 1994. Frog farming in Thailand. In K. P. P. Nambiar & T. Singh (Eds.), *INFOFISH-AQUATECH '94 International Conference on Aquaculture*, (pp. 126-130). Colombo, Sri Lanka: INFOFISH.
- Petcharat, T. and Benjakul, S. 2017. Property of fish gelatin gel as affected by the incorporation of gellan and calcium chloride. *Food Biophysics*. 12(3): 339-347.
- Piez, K.A. and Gross, J. 1960. The amino acid composition of some fish collagens: the relation between composition and structure. *Journal of Biological Chemistry*. 235: 995-999.
- Purna Sai, K. and Babu, M. 2001. Studies on *Rana tigerina* skin collagen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 128(1): 81-90.
- Regenstein, J. M. and Zhou, P. 2007. Maximising the value of marine byproducts. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Romdhane, M. and Gourdon, C. 2002. Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*. 87(1): 11-19.
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S. and Kishimura, H. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*. 124: 97-105.
- Tu, Z. C., Huang, T., Wang, H., Sha, X.-m., Shi, Y., Huang, X.-q., Man, Z.-z. and Li, D.-j. 2013. Physico-chemical properties of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmich thysnobilis*) scales by ultrasound-assisted extraction. *International Journal of Food Properties*. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-1239-9>.
- Ut, S.S., Jongjareonrak, A. and Rawdkuen, S. (2012). Re-extraction, recovery, and characteristics of skin gelatin from farmed giant catfish. *Food Bioprocess Technol*. 5:1197-1205.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9(2): 161-169.
- Wasswa, J., Tang, J. and Gu, X. 2007. Utilization of fish processing by-products in the gelatin industry. *Food Reviews International*. 23(2): 159-174.
- Widyasari, R. and Rawdkuen, W. 2014. Extraction and characterization of gelatin from chickenfeet by acid and ultrasound assisted extraction. *Food and Applied Bioscience Journal*. 2(1): 83-95.
- Schrieber, R., and Gareis, H. 2007. *Gelatin handbook: theory and industrial practice*. John Wiley & Sons, Hochstadt.

- Suslick, K. S. 1994. The chemistry of ultrasound. pp. 138-155. In "The year book of Science & the future". Encyclopedia Britannica, Chicago.
- Zhang, Z. S., Wang, L. J., Li, D., Jiao, S. S., Chen, X. D. and Mao, Z. H. 2008. Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. Separation and Purification Technology. 62(1): 192-198.
- Zou, Y., Wang, L., Cai, P., Li, P., Zang, M., Sun, Z., Sun, C., Xu, W. and Wang, D. 2017. Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. International Journal of Biological Macromolecules. 105: 1602-1610.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate Analysis)

#### ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยอบในตู้ไฟฟ้า (AOAC, 1999)

##### 1. อุปกรณ์

- 1.1 ตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส
- 1.2 ถ้วยอะลูมิเนียม
- 1.3 โถดูดความชื้น
- 1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า

##### 2. วิธีการ

- 2.1 อบอุ่นสำหรับหาความชื้น (ถ้วยอะลูมิเนียม) ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 2.2 นำถ้วยอะลูมิเนียมออกจากตู้อบลมร้อนใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง
- 2.3 ชั่งน้ำหนัก และจดบันทึก
- 2.4 กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
- 2.5 ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว
- 2.6 นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น
- 2.7 นำถ้วยอะลูมิเนียมเข้าตู้อบ และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
- 2.8 จดบันทึก

##### 3. การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของเจลลาติน

#### ข.1 วิธีวิเคราะห์ค่าสีของเจล ( $L^*a^*b^*$ )(Hunter lab)

1.1 นำเจลลาตินที่สกัดได้ทั้งหมดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส

1.2 นำสารละลาย 25 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร (โดยควบคุมภาชนะบรรจุให้เป็นบีกเกอร์จากบริษัทเดียวกัน)

1.3 นำสารละลายไปบ่มให้เกิดเจลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

1.4 นำเจลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าสี โดยใช้เครื่อง Hunter lab (ColorFlex, Hunter Lab Inc., Reston, VA, USA) โดยที่วัดค่าสีในรูปแบบของ  $L^*$ (ความสว่าง)  $a^*$ (สีแดง/สีเขียว)  $b^*$ (สีเหลือง/สีน้ำเงิน)

#### ข.2 วิธีวิเคราะห์ค่าความแข็งแรงของเจล

2.1 นำเจลลาตินผงที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 6.67% ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส

2.2 นำสารละลายมาบรรจุในท่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร ความสูง 3.5 เซนติเมตร ขนาดบรรจุ 10 มิลลิลิตร

2.3 นำสารละลายไปบ่มให้เกิดเจลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

2.4 ทดสอบความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส รุ่น TA-XI2 (Texture Technologies Corp., USA) โดยการเจาะขนาด 5 กิโลกรัม เข้าไปในเจลลาตินด้วยความเร็ว 1 มิลลิเมตร/วินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5 ระหว่างการวิเคราะห์ให้เก็บรักษาเจลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลา

## ภาคผนวก ค

### การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรต

#### 1. สารเคมี

##### 1.1 สารละลายไบยูเรต

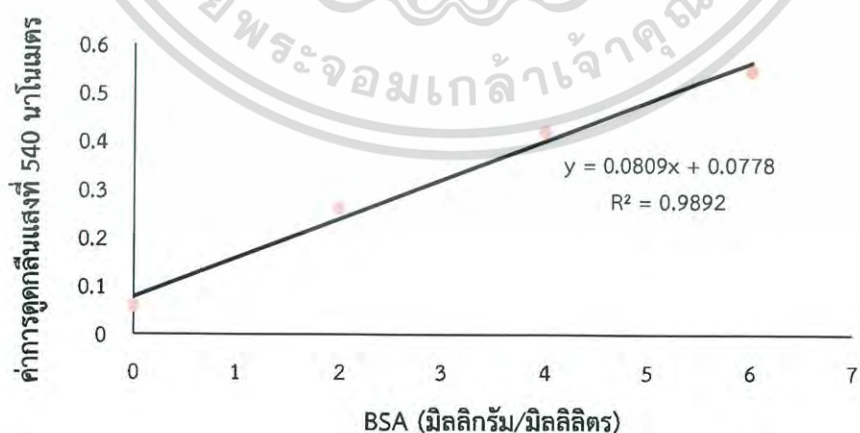
เตรียมโดยใช้คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 1.5 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมทาทาเรต 6.00 กรัม จากนั้นทำการละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยทำการกวนผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

##### 1.2 น้ำกลั่น

1.3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ BSA (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

#### 2. การวิเคราะห์

- 2.1 ปิเปตตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
- 2.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
- 2.3 ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer
- 2.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30-40 นาที
- 2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
- 2.6 เตรียมสารละลายมาตรฐานของโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ BSA (ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ทำกราฟมาตรฐาน
- 2.7 นำค่าที่ได้จากข้อ 2.5 มาคำนวณหาปริมาณโปรตีน จากสมการของกราฟมาตรฐานที่ได้จากข้อ 2.6 (ภาพ ค.1)



ภาพที่ ค.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร กับปริมาณ BSA (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### การวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีไพรีน ตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963)

#### 1. สารเคมี

1.1 สารละลายออกซิแดนซ์ : เตรียมโดยผสม Chloromine T ร้อยละ 7 กับสารละลาย acetate/phosphate buffer ที่มี pH 6.0 ในอัตราส่วน 1: 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

1.2 สารละลาย Ehrlich's reagent ที่มีส่วนผสมของ

- สาร p-dimethylamino-benzaldehyde ที่ละลายในกรด Perchloric ร้อยละ 60 เตรียมโดยละลาย p-dimethylamino-benzaldehyde จำนวน 3 กรัม ในกรด Perchloric ปริมาณ 3 มิลลิลิตร

- Isopropanol ผสม p-dimethylamino-benzaldehyde กับสารละลาย isopropanol ในอัตราส่วน 3: 13 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

#### 2. การเตรียมตัวอย่าง

2.1 ชั่งตัวอย่าง 0.5-1 กรัม ใส่หลอดทดลองแบบฝาเกลียว เต็มไฮโดรเจนคลอไรด์ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียว

2.2 นำไปไฮโดรไลซ์ ที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ใน oil bath จนได้สารละลายใส ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Activated carbon (ตักปลายช้อน) และทำการ Vortex

2.3 กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ใน Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และล้างด้วยน้ำกลั่น

2.4 ทำให้เป็นกลางด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ จนได้ค่าพีเอช ประมาณ 6.0-6.8 และปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

#### 3. การวิเคราะห์

3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแบบฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร

3.2 ปิเปต Iso-propanol 0.2 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน

3.3 ปิเปตสารละลายออกซิแดนซ์ 0.1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 4 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.4 ปิเปตสารละลาย Ehrlich's reagent 1.3 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ใน Water bath

3.5 ทำให้เย็นโดยเปิดน้ำไหลผ่าน 2-3 นาที ทำให้เจือจางด้วย Iso-propanol 3.3 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 558 นอร์มอล ภายใน 24 ชั่วโมง

ตารางภาคผนวก ง.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานไฮดรอกซีไพโรลีน

หลอดทดลองที่	น้ำ (ไมโครลิตร)	ไฮดรอกซีไพโรลีน 100 ppm (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของไฮดรอกซีไพโรลีน (ppm)
1	100.00	0.00	0
2	93.75	6.25	10.00
3	87.50	12.50	12.50
4	75.00	25.00	25.00
5	50.00	50.00	50.00
6	0.00	100.00	100.00

## การคำนวณ

ใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานไฮดรอกซีไพโรลีน

เช่น  $Y = 0.0085x + 0.0087$ ,  $R^2 = 0.9998$

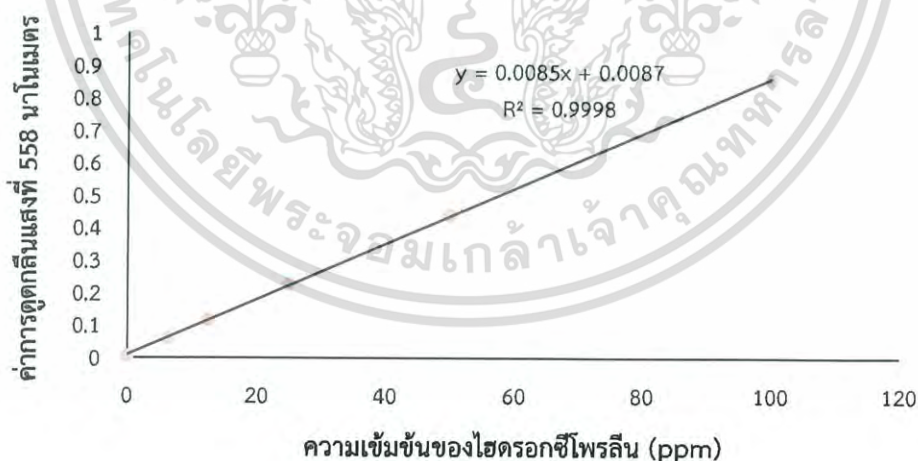
ปริมาณไฮดรอกซีไพโรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร) = (ค่าการดูดกลืนแสง - 0.0087) / 0.9998  
=  $x$  มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายตัวอย่างปริมาณ 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณไฮดรอกซีไพโรลีน  $x$  มิลลิกรัมต่อลิตร

ถ้าสารละลายตัวอย่างปริมาณ 100 มิลลิลิตร มีปริมาณไฮดรอกซีไพโรลีน  $\frac{x}{10}$  มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายจำนวน 100 มิลลิลิตร มาจากตัวอย่างจำนวน  $A$  กรัม

∴ ตัวอย่างมีปริมาณไฮดรอกซีไพโรลีน  $\frac{x}{10A}$  มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง



ภาพภาคผนวก ง.1 กราฟมาตรฐานไฮดรอกซีไพโรลีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

### การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของเจลาตินจากหนังกบเลือดตามวิธีของ Laemli (1960)

#### 1. สารเคมี

- 1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ (electrode buffer) ที่มีส่วนผสมของ
  - Tris ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ จำนวน 3.0285 กรัม
  - SDS ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จำนวน 1 กรัม
  - Glycine ความเข้มข้น 192 มิลลิโมลาร์ จำนวน 14.4134 กรัม
 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร
- 1.2 Fixing solution ที่มีส่วนผสมของ
  - Methanol ปริมาณ 500 มิลลิลิตร
  - กรด Acetic ปริมาณ 100 มิลลิลิตร
  - น้ำกลั่น ปริมาณ 400 มิลลิลิตร
 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร
- 1.3 Staining solution
  - Coomassie brilliant blue R250 จำนวน 0.5 กรัม
  - Methanol ปริมาณ 150 มิลลิลิตร
  - กรด Acetic ปริมาณ 50 มิลลิลิตร
 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร
- 1.4 Sample buffer (SDS non-reducing buffer)
  - Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร
  - SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาณ 4 มิลลิลิตร
  - กลีเซอรอล ปริมาณ 2 มิลลิลิตร
  - โบรโมฟินอลบลู จำนวน 0.03 กรัม
 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร
- 1.5 สารที่ใช้ในการเตรียมเจล
  - Acrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 30
  - Tris ความเข้มข้น 1.5 M pH 8.8
  - Tris ความเข้มข้น 0.5 M pH 6.8
  - น้ำ DI
  - SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10
  - APS ความเข้มข้นร้อยละ 10
  - TEMED

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. อุปกรณ์

- 2.1 Slab gel electrophoresis apparatus
- 2.2 Power supply

## 3. การเตรียมตัวอย่าง

- 3.1 ละลายตัวอย่างด้วย 5% SDS ต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
- 3.2 นำตัวอย่างไป Centrifuge ที่ 10,000 RPM นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารละลายส่วนใส
- 3.3 วัดปริมาณโปรตีนที่ละลายใน SDS ด้วยวิธีไบยูเรต
- 3.4 นำตัวอย่างผสมกับ Sample buffer ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 3.00% แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที

## 4. การเตรียม Acrylamide gel

- 4.1 ปิเปตสารเคมีผสมกันดังตาราง
- 4.2 หยอด Running gel ระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ใช้ดีเจล ให้ระดับสารละลายห่างจากขอบบนของกระจกประมาณ 1.75 ซม. ทิ้งให้เกิด Polymerization ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนเจลแข็งตัว
- 4.3 หยอด Stacking gel จนถึงขอบกระจก แล้วเสียบหวี ให้เกิดช่องสำหรับโหลดตัวอย่าง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 45 นาที จนเจลแข็งตัว

## 5. การรันตัวอย่าง

- 5.1 เตรียมและติดตั้งแผ่นกระจกที่บรรจุเจลเข้ากับกล่อง เต็ม Electrode buffer ให้ท่วมแผ่นเจล
- 5.2 ดูดตัวอย่างปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ด้วย Micro pipette แล้วหยอดลงใน Well ของแผ่นเจล
- 5.3 ทำเช่นเดียวกับ Protein standard marker
- 5.4 ต่อกล่องติดตั้งเจลเข้ากับ Power supply เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 20 mA/gel ประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีน้ำเงินของโบรมิโนฟีนอลบลูเคลื่อนลงไปที่ขอบล่างของเจลและปิดกระแสไฟ

## 6. การย้อมและการล้างแผ่นเจล

- 6.1 นำแผ่นเจลออกจากกระจกอย่างระมัดระวัง แล้วแช่แผ่นเจลลงใน fixing solution แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า 30 นาที
- 6.2 เท Fixing solution ออกแล้วย้อมสีโดยใช้ Staining solution วางบนเครื่องเขย่าแล้วทิ้งไว้ข้ามคืน
- 6.3 เท Staining solution ออกแล้วเติม Destaining solution จนท่วมแผ่นเจล แช่นานประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าพื้นหลังของเจลใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง จ.1 การเตรียมเจล

Reagents	Running gel ร้อยละ 7.5	Stacking gel ร้อยละ 4
Acrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 30	3.75 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร
Tris ความเข้มข้น 1.5 M pH 8.8	3.75 มิลลิลิตร	-
Tris ความเข้มข้น 0.5 M pH 6.8	-	1.875 มิลลิลิตร
น้ำ DI	7.27 มิลลิลิตร	4.50 มิลลิลิตร
SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10	150 ไมโครลิตร	75 ไมโครลิตร
APS ความเข้มข้นร้อยละ 10	7.5 ไมโครลิตร	37.5 ไมโครลิตร
TEMED	7.5 ไมโครลิตร	4.5 ไมโครลิตร
ทั้งหมด	15 มิลลิลิตร	7.5 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล กิตติ อินทองคำ  
 วัน เดือน ปีเกิด 25 พฤษภาคม 2539  
 ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ.2562 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ-นามสกุล ขนิษฐา บุญพูน  
 วัน เดือน ปีเกิด 10 มีนาคม 2540  
 ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ.2562 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ-นามสกุล เบญจวรรณ นิลรัตน์นันท  
 วัน เดือน ปีเกิด 22 เมษายน 2539  
 ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ.2562 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้