การศึกษาโปรตีนสกัดจากตั๊กแตนปาทังก้า

STUDY ON PROTEIN FRACTION FROM BOMBAY LOCUSTS

(*Patanga succuncta*)

ฐิตินันท์ ยุทธวรวิทย์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การสกัดโปรตีนจากตั๊กแตนปาทังก้า

STUDY ON PROTEIN FRACTION FROM BOMBAY LOCUSTS (*Patanga succuncta*)

จัดทำโดย

นางสาวฐิตินันท์ ยุทธวรวิทย์ รหัสนักศึกษา 58080029

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ผศ.ดร. ยุพร พืชกมุทร)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

18 / ก.ค. / 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ การสกัดโปรตีนจากตั๊กแตนปาทังก้า
ชื่อนักศึกษา ฐิตินันท์ ยุทธวรวิทย์ รหัสนักศึกษา 58080029
หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
พ.ศ. 2562
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ยุพร พืชกมุทร

บทคัดย่อ

ในการทดลองนี้ศึกษาการกระจายตัวของสารประกอบไนโตรเจนในตั๊กแตนปาทังก้า โดยทำการสกัดโปรตีนเป็นลำดับด้วยรีเอเจนต์ต่างๆดังนี้ สกัดด้วยน้ำกลั่น และนำส่วนที่สกัดด้วยน้ำไปตกตะกอนด้วยไตรคลอโรอะซิติก(TCA)จะได้ไนโตรเจน 2 ส่วนคือ ส่วนที่ละลายในน้ำ และส่วนที่ตกตะกอนด้วย TCA จากนั้นนำกากที่เหลือจากการสกัดด้วยน้ำกลั่นมาเติมสารละลาย 0.5 M KCl เพื่อแยกส่วนของสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายในเกลือ และเติม0.1M NaOH เพื่อแยกส่วนประกอบของไนโตรเจนที่ละลายในด่าง รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในกากสุดท้ายที่เหลืออยู่ ผลการทดลองพบว่าการกระจายตัวของสารประกอบไนโตรเจนในส่วนต่างๆเป็นดังนี้ ส่วนที่ละลายในน้ำ, ส่วนที่ตกตะกอนด้วย TCA, ส่วนที่ละลายในเกลือ, ส่วนที่ละลายในด่าง และกากที่เหลือสุดท้าย คิดเป็น 29.43%, 4.09%, 28.25%, 29.77%, และ8.45% ของโปรตีนทั้งหมด ตามลำดับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบย่อยของโปรตีนในส่วนที่ ตกตะกอนด้วย tca ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อยมีขนาดดังนี้ 20-15 kD, 30-20kD, 37-30kD, 50-45kD และ 70-60kD

คำสำคัญ : ตั๊กแตนปาทังก้า, โปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Study on Protein fraction from Bombay Locusts (*Patanga succuncta*)
Student's name	Thitinan Yutthaworawit Student ID : 58080029
Program	Bachelor of Science, Major of Food Science and Technology
Year	2019
Advisor	Asst. Prof. Dr. Yuporn Peuchkamut

Abstract

In this experiment, the distribution of nitrogen compounds in Bombay locusts was studied. The extracting protein with various reagents were started by using distilled water. The supernatant was precipitated by TCA and got 2 parts of nitrogen including part of dissolved in water and the precipitated parts with TCA. The remaining sediment from distilled water was further extracted by added the 0.5M KCl solution to separate parts of dissolved nitrogen compounds in salt. After that added 0.1M NaOH to separate parts of dissolved nitrogen compounds in base and including analyze the amount of nitrogen in the final residue. The results showed that the distribution of nitrogen compounds in various parts as follows water extracted, precipitated by TCA, salt extracted, alkali extracted, and residue were 29.43%, 28.25%, 29.77%, 4.09%, and 8.45% respectively. The results of the analysis of sub-protein components in the precipitated by TCA section was done by electrophoresis method. It was found that most of the subunits were 20-15 kD, 30-20kD, 37-30kD, 50-45kD, and 70-60kD

Keyword : Bombay Locust, Protein

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่อง การศึกษาโปรตีนสกัดจากตั๊กแตนปาทังก้า โดยใช้รีเอเจนต์ต่างๆ ทำกัดสกัดโปรตีนเป็นลำดับเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ ข้าพเจ้าต้องขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ยุพร พืชกมุทร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษเรื่องนี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ รวมทั้งการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจสอบข้อบกพร่อง และชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหา ตลอดจนการให้กำลังใจในระหว่างการทำงาน จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ชมพูนุท สีห์โสภณ ที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ในการดำเนินงานปัญหาพิเศษ และอุปกรณ์ในการดำเนินงานปัญหาพิเศษ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการทำปัญหาพิเศษ ทั้งอุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ สถานที่ในการดำเนินงานปัญหาพิเศษ ตลอดจนช่วยดูแลข้าพเจ้าในระหว่างการดำเนินงานปัญหาพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ นางสาวนิพัทธา ชาติสุวรรณ นักศึกษาปริญญาเอก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยอำนวยความสะดวกทั้งด้านอุปกรณ์ สารเคมี การให้คำแนะนำ คำอธิบายต่างๆ ชี้แนะแนวทางที่คาดว่าจะเป็นไปได้ และมีส่วนช่วยแก้ไขข้อผิดพลาด ทำให้ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือในการดำเนินปัญหาพิเศษ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณมารดาและครอบครัวที่คอยให้กำลังใจที่ดี พร้อมทั้งให้การสนับสนุนทุนทรัพย์และให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้านที่สามารถทำได้ รวมถึงผู้ที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้ทุกๆท่าน สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าหวังว่าผลจากความตั้งใจและความทุ่มเทของข้าพเจ้า จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจรายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ฐิตินันท์ ยุทธวรวิทย์

10 กรกฎาคม 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ตั๊กแตนปาทังก้า (*Patanga succuncta*)	
2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของตั๊กแตนปาทังก้า	2
2.1.2 ลักษณะ	3
2.1.3 วงจรชีวิต	3
2.1.4 พืชอาหาร	4
2.1.5 รูปแบบการนำไปบริโภค	4
2.1.6 คุณค่าทางโภชนาการ	4
2.2 โปรตีน	
2.2.1 โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีน	5
2.2.2 การจำแนกประเภทของโปรตีน	6
2.2.3 หน้าที่ของโปรตีนในอาหาร	7
2.2.4 โปรตีนในกล้ามเนื้อสัตว์	8
2.3 SDS-PAGE	
2.3.1 อุปกรณ์	9
2.3.2 สารเคมี	10
2.3.3 โปรตีนมาตรฐาน	10
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

2.4.1 องค์ประกอบโปรตีนในกล้ามเนื้อของปลาซาร์ดีน(*Sardinops melanosticta*) และปลาทู(*Pneumatophorus japonicus japonicus*) 11

2.4.2 การสกัดโปรตีนจากหนอนนก (*Tenebrio molitor*) 12

2.4.3 การปรับปรุงและความสามารถทางเทคนิคของโปรตีนจากหนอนนก *Tenebrio molitor* 13

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี 14

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 15

3.3 สถานที่ทำการทดลอง 15

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง 15

3.4.2 ศึกษาชนิดของโปรตีนที่สกัดจากตั๊กแตนปาทังก้า 15

3.4.3 การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด 16

3.4.4 การศึกษาชนิดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE 16

บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการสกัดโปรตีนจากตั๊กแตนปาทังก้าด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ 17

4.2 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE 18

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล 20

5.2 ข้อแสนอแนะ 20

บรรณานุกรม 21

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 22

ภาคผนวก ข 24

ประวัติผู้เขียน 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 พลังงาน และองค์ประกอบหลักของแมลงกินได้ ต่อน้ำหนักสด 100 กรัม 4

ตารางที่ 4.1 ผลของรีเอเจนต์ที่มีต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ 17

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของโปรตีนชนิดต่างๆ ที่สกัดจากตั๊กแตนปาทังก้า จากปริมาณโปรตีนทั้งหมด 18

สารบัญรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

รูปที่ 2.1.1 ตั๊กแตนปาทังก้า 2
รูปที่ 2.1.2 Anatomy of Patanga succuncta 3
รูปที่ 2.3.1 ชุดอุปกรณ์รันเจล 10
รูปที่ 4.1 ผลการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนตั๊กแตนปาทังก้าที่สกัดจากรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในยุคปัจจุบัน ปัญหาจำนวนประชากรที่กำลังเพิ่มมากขึ้น ทำให้เราต้องเริ่มมองหาแหล่งโปรตีนและพลังงานทางเลือกใหม่ เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว ทางเลือกที่กำลังเป็นที่สนใจ คือ แหล่งพลังงาน และโปรตีนจากแมลง เนื่องด้วยคุณค่าทางโภชนาการของแมลงที่มี โปรตีนสูง ไขมันต่ำ และมีแร่ธาตุที่จำเป็น และแมลงยังมีจำนวนมาก จึงกลายเป็นที่สนใจ ที่จะเป็นแหล่งโปรตีนที่ยั่งยืนในอนาคตอีกด้วย (National *Geographic* Thailand, 2018)

จากงานวิจัยทั้งภายในประเทศ และต่างประเทศพบว่า แมลงที่สามารถนำมารับประทานได้หลายชนิดมีโปรตีนในปริมาณสูง โดยเฉพาะ แมลงสายพันธุ์ *Patanga succincta* หรือ ตั๊กแตนปาทังก้า มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 27.6 กรัมต่อน้ำหนักสด 100 กรัม (กรมอนามัย, 2553) ซึ่งปริมาณโปรตีนสูง เมื่อเทียบกับแมลงชนิดอื่นๆ ที่พบมากในประเทศไทย ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงสนใจสกัดโปรตีนจากตั๊กแตนปาทังก้า โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาชนิด และขนาดโมเลกุลของโปรตีนจากตั๊กแตนปาทังก้า การสกัดแยกชนิดโปรตีนจากตั๊กแตนปาทังก้า จะช่วยเพิ่มช่องทางของการใช้ประโยชน์จากแมลงให้มากขึ้น รวมทั้งช่วยลดปัญหาการระบาดของตั๊กแตนปาทังก้า ที่ก่อความเสียหายแก่พืชผลทางการเกษตร โดยการนำศัตรูพืชมาเปลี่ยนเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกใหม่สำหรับอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาการสกัดโปรตีนในตั๊กแตนปาทังก้า
2. เพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในตั๊กแตนปาทังก้า

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับความรู้จากการศึกษา และทดลองวิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ
2. ทำให้ทราบปริมาณโปรตีนในตั๊กแตนปาทังก้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ตั๊กแตนปาทังก้า (*Patanga succuncta*) (สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, 2545)

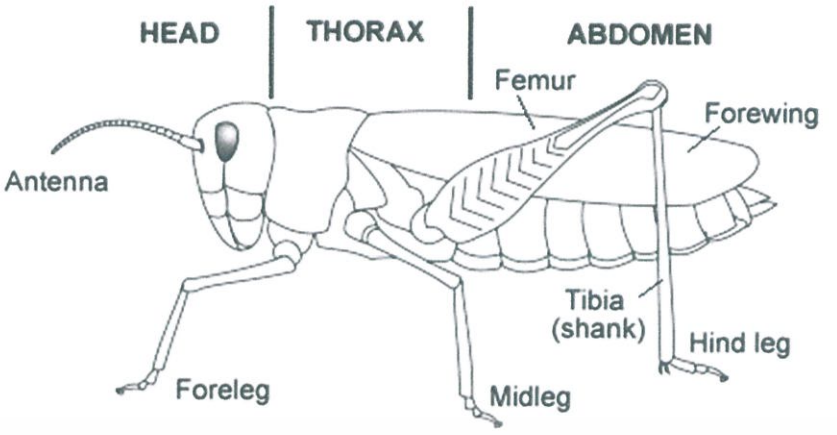
รูปที่ 2.1.1 ตั๊กแตนปาทังก้า

ที่มา : สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, 2545

2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของตั๊กแตนปาทังก้า

ชื่อวิทยาศาสตร์	Patanga succincta (Linnaeus)
ชื่อสามัญภาษาไทย	ตั๊กแตนปาทังก้า
ชื่อสามัญ	Bombay locust
วงศ์	Acrididae
อันดับ	Orthopter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1.2 Anatomy of *Patanga succuncta*

ที่มา : https://www.tes.com/lessons/ieSBiPCjrh3_og/all-about-locusts-and-whales

2..1.2 ลักษณะ

ตัวอ่อน จะมีสีเขียวเหลือง แต่เมื่อเป็นตัวแก่จะมีสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม ระยะตัวอ่อนประมาณ 56 วัน ตัวเต็มวัย มีขนาดใหญ่ รูปร่างเรียวยาว บินเร็ว และว่องไว ในขณะที่บินจะเห็นปีกคู่ในเป็นสีชมพู ขนาดลำตัวยาว 6-8 ซม. ตัวผู้เล็กกว่าตัวเมีย โดยตัวผู้มีความยาววัดจากหัวถึงปลายปีก 6-6.5 เซนติเมตร ตัวเมียยาว 7.6-7.8 เซนติเมตร ทั้งตัวผู้ และตัวเมีย ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อนสลับกับสีน้ำตาลแก่ แก้มทั้ง 2 ข้างมีแถบสีดำพาดจากขอบตารวมด้านล่างถึงปาก ปีกยาวเลยปลายส่วนท้องไปประมาณ 1/5 เท่าของตัว ปีกคู่แรกแข็งมีแถบสีเหลืองและสีน้ำตาล ยาวไปต่อกับแถบสีเดียวกันกับแถบที่อยู่บนสันอกและหน้าผากพอดี ปีกคู่ที่ 2 เป็นเยื่อบางใส โคนปีกมีสีม่วงแดงหรือสีชมพู

2..1.3 วงจรชีวิต

ในรอบ 1 ปี มีการขยายพันธุ์เพียง 1 ครั้ง ฤดูผสมพันธุ์อยู่ในช่วงเดือนมีนาคม-เมษายน มีอัตราส่วนตัวผู้ : ตัวเมีย 1:1 ตัวเมียวางไข่ในดิน ระหว่างเดือนเมษายน-พฤษภาคม (เป็นระยะฝนแรกของปี) โดยวางไข่เป็นฝักลึกลงไปในดินที่มีลักษณะร่วนซุย ลึก 2-7 เซนติเมตร และมีความชื้นพอเหมาะ ลักษณะฝักไข่มีรูปร่างเป็นทรงกระบอกยาว 2.3-5 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มม. ห่อหุ้มด้วยฟองน้ำสีขาว ตัวเมียวางไข่ได้ 1-3 ฝัก ซึ่งไข่ 1 ฝัก มีจำนวน 96-152 ฟอง เพราะฉะนั้นไข่ 1-3 ฝักมีจำนวนรวม 288-451ฟอง อายุไข่ 35-51 วัน (เมษายน-พฤษภาคม)ไข่ฟักเป็นตัวอ่อนช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม ตัวอ่อนมีการลอกคราบ 7-8 ครั้ง ช่วงอายุตัวอ่อน 56-81 วัน ตั๊กแตนเมื่อวางไข่แล้วก็จะตายในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 พืชอาหาร

ตั๊กแตนปาทังก้าสามารถกินพืชอาหารได้ 34 ชนิด พืชที่ชอบมากที่สุดได้แก่ ข้าวโพด, อ้อย, ข้าวฟ่าง, ถั่วเหลือง, ข้าว , มะพร้าว, หญ้าตีนติด, ปาล์มน้ำมัน, ไผ่ เป็นต้น

2.1.5 รูปแบบการนำไปบริโภค

ใช้เป็นอาหารโดยนำมาคั่ว ปิ้ง ทำทอดมัน และที่นิยมมากคือ นำมาทอดกรอบ

2.1.6 คุณค่าโภชนาการ

ตารางที่2.1 พลังงาน และองค์ประกอบหลักของแมลงกินได้ ต่อน้ำหนักสด 100 กรัม

แมลง	พลังงาน (กิโลแคลอรี)	ความชื้น (กรัม)	โปรตีน (กรัม)	ไขมัน (กรัม)	คาร์โบไฮเดรต (กรัม)
จิ้งโกร่ง	188	67	17.5	12.0	2.4
จิ้งหรีด	133	73	16.6	6.0	1.0
ดักแด้ไหม	162	70	14.7	8.3	4.7
ตั๊กแตนปาทังก้า	167	66	27.6	4.7	1.2
ตัวอ่อนของต่อ	140	73	14.8	6.8	4.8
แมลงกินูน	98	76	18.1	1.8	2.2
หนอนรถด่วน	230	67	9.2	20.4	2.5

ที่มา : วารสารโภชนาการ (2548)

จากตารางที่ 2.1 เมื่อเทียบกับแมลงชนิดอื่นตั๊กแตนปาทังก้า มีปริมาณโปรตีนที่สูงกว่าแมลงอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด แต่มีปริมาณไขมัน และคาร์โบไฮเดรตที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับแมลงอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 โปรตีน

โปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของเซลล์ รวมทั้งเป็นระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต มนุษย์และสัตว์สังเคราะห์โปรตีนโดยใช้กรดอะมิโนที่ได้รับจากพืชและสัตว์ รวมทั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนหลายชนิดในร่างกาย โมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยธาตุต่างๆ คิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก คือ คาร์บอน 50-55 ออกซิเจน 20-23 ไนโตรเจน 12-19 ไฮโดรเจน 6-7 กำมะถัน 0.2-3.0 โปรตีนบางชนิดมีฟอสฟอรัสบ้างเล็กน้อย รวมทั้งบางชนิดมีโลหะเช่น เหล็ก ทองแดง และสังกะสี เป็นองค์ประกอบแต่มีในปริมาณน้อยมาก ซึ่งจะพบว่าการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเคห์ดาห์ลมักจะตั้งสมมุติฐานว่าโปรตีนประกอบด้วยไนโตรเจนร้อยละ 16 หน่วยที่เล็กที่สุดของโปรตีนคือ กรดอะมิโน

2.2.1 โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีน

โมเลกุลของโปรตีนประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโนจำนวนมาก และมีโครงสร้างหลายแบบคือ

2.2.1.1 โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) เป็นโครงสร้างที่แสดงลำดับการเรียงของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ โดยการนับตำแหน่งของกรดอะมิโนในโปรตีนจะเริ่มจากปลายด้านหมู่อะมิโนเป็นตำแหน่งที่ 1 โดยปลายด้านหมู่อะมิโนเรียกว่า N-terminal และนับต่อไปเรื่อยๆ ไปจนถึงปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลดังโครงสร้างด้านล่าง

2.2.1.2 โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structrue) เป็นโครงสร้างส่วนใดส่วนหนึ่งของโมเลกุล ประกอบด้วยแบบที่พันกันเป็นเกลียวคล้ายสปริง เรียกว่า เกลียว แอลฟา (α-helix) และแบบที่คล้ายจีบที่พับซ้อนกันเป็นระเบียบคล้ายจีบของกระโปรงพลีท เรียกว่า แผ่นจีบบีตา (β-plaeted sheet) และแบบเกลียวที่ไม่มีระเบียบ (random coil) การขดเป็นเกลียวหรือการพับซ้อนกันเพื่อให้มีเสถียรภาพในธรรมชาติ โดยจะมีการการม้วนพับเอาส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าไว้ด้านใน และหันเอาส่วนด้านที่ชอบน้ำออกสู่ด้านนอก

2.2.1.3 โครงสร้างแบบตติยภูมิ เป็นโครงสร้างของโมเกกุลที่มีสายพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีโครงสร้างแบบทุติยภูมิแบบต่าง ๆ อัดเข้าด้วยกันเป็นโครงสร้างสามมิติ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ ซับซ้อน แต่เพื่อที่จะทำให้โมเลกุลมีเสถียรภาพที่สุด ดังรูปที่ 1.1 เป็นโปรตีนที่พบในถั่ว คือการจัดเรียงตัวของหมู่ไม่ชอบน้ำเข้าสู่ด้านในของโมเลกุลและหมู่ที่ชอบน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่มีประจุให้มาอยู่ที่ผิวในส่วนที่จะสัมผัสกับน้ำ แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนชนิดที่เป็นก้อน (globular protein) ส่วนใหญ่ส่วนที่สัมผัสกับน้ำประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีขั้วเกือบครึ่งหนึ่งรวมทั้งส่วนที่มีขั้วส่วนหนึ่งก็จะอยู่ด้านในของโมเลกุลทั้งนี้มาจากข้อจำกัดของการม้วนพับของโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.4 โครงสร้างแบบจตุรภูมิ เป็นโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนที่เกิดจากสายพอลิเพป-ไทด์มากกว่าหนึ่งสายมาเกาะเกี่ยวเข้าด้วยกัน อาจเป็นแบบสองสาย (dimers) สามสาย (trimers) สี่สาย (tetramers) หรือหลายๆ สาย (oligomers) เช่น บีตา-แลกโตโกลบูลิน พบเป็นแบบชนิดสองสายที่พีเอช 5-8 แต่เป็นแบบ 8 สาย ที่พีเอช 3-5 และเป็นแบบ 1 สายที่ พีเอชมากกว่า 8 สายพอลิ-เพปไทด์ที่มาเกาะเกี่ยวกันอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิด เช่นฮีโมโกลบินเป็นโครงสร้างแบบจตุรภูมิชนิดสี่สายพอลิเพปไทด์ที่ต่างกัน 2 ชนิดมาเกาะเกี่ยวกัน

2.2.2 การจำแนกประเภทของโปรตีน

โปรตีนอาจถูกจำแนกได้หลายวิธี เช่น การจำแนกตามหน้าที่ ตามรูปร่าง และการจำแนกตามองค์ประกอบในโมเลกุลของโปรตีนหรือการจำแนกตามคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ เช่น การละลายของโปรตีนในตัวทำละลายเป็นต้น สำหรับการจำแนกประเภทของโปรตีนที่พิจารณาจากองค์ประกอบในโมเลกุลสามารถแบ่งออกไปเป็น 3 ประเภทคือ โปรตีนอย่างง่ายหรือโปรตีนเชิงเดี่ยว (simple protein) โปรตีนเชิงซ้อนหรือคอนจูเกตโปรตีน (conjugated protein) และอนุพันธ์โปรตีน (derrived protein)

2.2.2.1 โปรตีนอย่างง่าย หมายถึง โปรตีนที่โมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนอย่เดียวเท่านั้น เป็นโปรตีนอิสระไม่ได้รวมกับสารใดๆ เมื่อผ่านการย่อยสลายแล้วจะได้กรดอะมิโนเพียงอย่างเดียว สามารถแบ่งย่อยออกตามโครงสร้างได้ 2 ช นิด คือ โปรตีนลักษณะเส้น (fibrous protein) ซึ่งโมเลกุลมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นยาวหรือขดเป็นเกลียวบางชนิดยืดหดได้ บางชนิดยืดหดไม่ได้ เช่น เคราติน (keratein) ไมโอซิน (myosin) ไฟโบรอิน (fibroin) เป็นต้น และโปรตีนลักษณะกลมหรือก้อน (giobular protein) ที่มีโมเลกุลเป็นรูปทรงกลม (spheroid) เช่น อัลบูมิน (albumins) เคซีน (casiens) เจลาติน (gelatins) เป็นต้น นอกจากนี้โปรตีนอย่างง่ายยังอาจแบ่งย่อยตามความสามารถในการละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

2.2.2.2 โปรตีนเชิงซ้อนหรือโปรตีนคอนจูเกต หมายถึง โปรตีนที่โมเลกุลประกอบด้วย 2 ส่วน เป็นโปรตีนอย่างง่ายกับส่วนที่เป็นสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนที่เรียกว่าหมู่พรอสเทติก (prosthetic groups) กรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรต ลิพิด หรือโลหะต่างๆ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งโปรตีนประเภทนี้ออกได้หลายชนิดตามหมู่พรอสเทติก

2.2.2.3 อนุพันธ์โปรตีน หมายถึง โปรตีนที่ได้จากการแปรรูปของโปรตีนอย่างง่ายและโปรตีนเชิงซ้อน ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือทางกายภาพ เช่น จากผลการไฮโดร-ไลซิสด้วยกรด ด่าง เอนไซม์ หรือความร้อน หรือเกิดจากการทำให้โปรตีนเสียโครงสร้างอนุพันธ์โปรตีนที่แบ่งตามระดับของการเปลี่ยนแปลงได้ 2 ชนิด ได้แก่

1. อนุพันธ์โปรตีนชนิดปฐมภูมิ เป็นอนุพันธ์โปรตีนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงเล็กน้อย แต่ทำให้คุณสมบัติโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป เช่น การแปลงสภาพจากธรรมชาติ (denatured) ของโปรตีนในไข่ต้มหรือการเกิดตะกอนของเคซินในน้ำนม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อนุพันธ์โปรตีนชนิดทุติยภูมิ เป็นอนุพันธ์โปรตีนที่เกิดขึ้นเมื่อพันธะเพปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนถูกทำลายกลายเป็นโปรตีนโมเลกุลเล็กๆ ขนาดแตกต่างกันหลายชนิดและมีชื่อเรียกแตกต่างกัน

2.2.3 หน้าที่ของโปรตีนในอาหาร

โปรตีนมีสมบัติต่าง ๆ เช่น การละลาย การดูดซับ การเกิดเจล การให้ความยืดหยุ่น และการเกิดโฟม เป็นต้น จึงมีการนำสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในอาหารชนิดต่าง ๆ คือ

2.2.3.1 ความสามารถในการละลาย การดูดซับน้ำ เนื่องจากโมเลกุลโปรตีนประกอบด้วยสารมีขั้ว จึงทำให้โปรตีนบางชนิดละลายน้ำได้ จึงมีการเตรียมเครื่องดื่มจากโปรตีน เช่น นมถั่วเหลือง โปรตีนบางชนิด เช่น โปรตีนในเนื้อสัตว์ ในแป้งสาลีและมีความสามารถในการดูดซับน้ำ ทำให้ความนุ่ม เช่น ความนุ่มของไส้กรอก และขนมเค้ก เป็นต้น

2.2.3.2 ความสามารถในการเกิดเจล โปรตีนจำพวกคอลลาเจนที่ได้จากหนังสัตว์ เช่น หนังหมู หนังวัว และโปรตีนอัลบูมินและโกลบูมินในไข่ขาว และเคซีนในน้ำนม สามารถเกิดเจลได้จากการแปลงสภาพจากธรรมชาติ โดยเมื่อโมเกลุลมีการคลายตัวออกจึงสามารถเกิดการ cross-link ของโมเลกุลเป็นโครงข่ายและอุ้มน้ำไว้ข้างใน จึงมีการนำมาใช้ในการผลิตอาหารต่าง ๆ เช่น คอลลาเจน ใช้ในการประสานในผลิตภัณฑ์เนื้อ น้ำนมใช้ทำโยเกิร์ตและเนยแข็ง ไข่ใช้ทำคัสตาร์ด เป็นต้น

2.2.3.3 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน เจลาตินและโปรตีนจากไข่ขาว ช่วยให้เกิดอิมัลชันได้ดี เนื่องจากไม่มีประจุจึงทำให้เป็นตัวเชื่อมระหว่างชั้นของไขมันและน้ำได้ จึงนิยมใช้เจลาตินในไอศกรีม ความสามารถในการเกิดโฟม

2.2.3.4 การเกิดโฟม เป็นความสามารถของโปรตีนในการเกิดเป็นฟิลม์ที่บรรจุอากาศไว้ข้างใน การเกิดโฟมจะเกิดได้ดีที่ค่าพีไอของโปรตีนเนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนไม่มีประจุ จึงไม่เกิดการผลักกัน โมเลกุลโปรตีนจึงรวมตัวกันได้ดี เกิดเป็นฟิลม์ที่เหนียวคงตัวดักจับอากาศไว้ได้ดี นอกจากนี้การจะให้โฟมมีเสถียรภาพต้องมีความเข้มข้นของโปรตีนเพียงพอ การเกิดโฟมของโปรตีนในไข่ขาวถูกนำมาใช้ในการขึ้นฟูของขนมเค้ก ขนมไข่และขนมสาลี่ เป็นต้น

2.2.3.5 การเกิดความเหนียวและยืดหยุ่น โปรตีนในข้าวสาลีคือ ไกลอะดินและกลูเตลิน เมื่อผสมกับน้ำแล้วนวดจะทำให้โมเลกุลโปรตีนบางส่วนคลายตัวออกเนื่องจากแรงกลและจากการนวดทำให้สามารถทำให้โปรตีนเหล่านี้จับตัวกันเป็นร่างแหที่มีความยืดหยุ่นโดยมีพันธะไฮโดรโฟบิก จึงทำให้มีความยืดหยุ่นดักจับแกสไว้ได้จึงทำให้เกิดการขึ้นฟูของขนมปังหรือขนมเค้ก

2.2.3.6 ให้สี กลิ่นรส และเนื้อสัมผัสแก่อาหาร เช่น สีและกลิ่นรส ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของขนมอบ ไดเพปไทด์ของกรดแอสพาร์ติกและฟินิลอะลานีนที่อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ให้รสหวานจึงใช้เป็นสารทดแทนน้ำตาลและกรดกลูตามิกที่อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมให้รสคล้ายเนื้อให้ความอร่อยกลมกล่อมแก่อาหาร จึงใช้เป็นสารปรุงรสอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 โปรตีนในกล้ามเนื้อสัตว์

กล้ามเนื้อของสัตว์ในส่วนที่เป็นองค์ประกอบของร่างกาย เช่น แขน ขา เราเรียกว่ากล้ามเนื้อลาย ส่วนกล้ามเนื้อที่เป็นส่วนของอวัยวะภายใน เช่น หัวใจ กระเพาะอาหาร ลำไส้ เราเรียกว่ากล้ามเนื้อเรียบ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะกล้ามเนื้อลาย เพราะเป็นแหล่งสำคัญของโปรตีนจากสัตว์ มัดกล้ามเนื้อดังแสดงในรูปที่ 4.9 ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อที่รวมกันเป็นกลุ่มย่อย ที่ถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในส่วนที่เรียกว่าเพอริไมเซียม (permicium) กลุ่มของกล้ามเนื้อหลายกลุ่มรวมกันเป็นมัดกล้ามเนื้อถูกห่อหุ้มด้วยอีพิไมเซียม (epimycium) ส่วนเซลล์กล้ามเนื้อจะถูกห่อหุ้มด้วยเอ็นโดไมเซียม (endomycium) หรือเรียกว่าซาร์โคเลมมา (sarcolemma) แต่ละเซลล์จะมีรูปร่างยาวๆ มองเห็นด้วยตาเปล่าผิดกับเซลล์ชนิดอื่นซึ่งมีขนาดเล็กจนไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสหลายนิวเคลียส แต่ละเซลล์มีความยาว 1-41 มิลลิเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.01 ถึง 0.1 มิลลิเมตร กล้ามเนื้อสัตว์น้ำมีเซลล์ที่สั้นกว่าของสัตว์บก แต่ละเซลล์จะประกอบด้วยเส้นใยเล็กๆ ที่เรียกว่า ไมโอไฟบริล (myofibril) ซึ่งล้อมรอบด้วยส่วนที่เป็นไซโทพลาซึมที่เรียกว่าซาร์โคพลาสมา ภายในซาร์โคพลาสมาประกอบด้วยไมโตคอนเดรีย ไรโบโซม ไลโซโซม และไกลโคเจน เซลล์เส้นใยกล้ามเนื้อ 1 เซลล์ ประกอบไปด้วย ไมโอไฟบริลเป็นจำนวน 1,000-2,000 หน่วย และหน่วยย่อยของไมโอไฟบริลเรียกว่า ไมโอฟิลาเมนท์ (myofilament) แต่ละไมโอไฟบริลจะพบเส้นใยชนิดหนา (thick filament) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-11 นาโนเมตร อยู่ในบริเวณแถบเอ (A band) จะปรากฏเป็นสีเข้มประกอบด้วยโปรตีนไมโอซิน และเส้นใยชนิดบาง (thin filament) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นาโนเมตรอยู่ในแถบไอ (I band) มีสีจางประกอบด้วยโปรตีนแอกติน แถบไอจะถูกแบ่งโดยเส้นซี(Z line) ระยะทางระหว่างเส้นซีเรียกว่าซาร์โคแมร์ (sarcromere) องค์ประกอบในแถบเอและแถบไอ เป็นองค์ประกอบที่มีการหดตัวคลายตัวได้ประกอบด้วยไมโอซิน และแอกตินตามลำดับ

โปรตีนในสัตว์ ประกอบไปด้วย

1. ไมโอไฟบริลลาร์โปรตีน

เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อสัตว์ โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ เนื่อง จากไมโอไฟบริลลาร์อยู่ในเส้นใยย่อยจึงอาจเรียกว่า โปรตีนเส้นใยย่อยสามารถละลายได้ในสารละลายเกลือ โปรตีนที่พบมากที่สุดในกลุ่มนี้ คือ ไมโอซิน แอกทิน โทรโปนิน และโทรโปไมโอซิน เป็นต้น (อิ่มเอิบ พันสด, 2006)

2. ซาร์โคปลาสมิกโปรตีน

เป็นโปรตีนที่ห่อหุ้มรอบเส้นใยย่อยซึ่งละลายอยู่ในส่วนของซาร์โคพลาสซึมจึงเรียกว่าซาร์โคปลาสมิกโปรตีน โดยมีประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด ซาร์โคปลาสมิกโปรตีนเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติจะละลายได้ในน้ำและสารละลายน้ำเกลืออ่อน ๆ โปรตีนในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยไมโอโกลบิน ฮีโมโกลบิน ไซโตโครม และเอนไซม์ต่างๆ เป็นต้น (อิ่มเอิบ พันสด, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สโตรมาโปรตีน

เป็นโปรตีนที่มีองค์ประกอบเหมือนกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจึงอาจเรียกอีกอย่างว่าโปรตีนจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สโตรมาโปรตีนมีอยู่ ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด โปรตีนในกลุ่มนี้ ได้แก่ คอลลาเจน อิลาสติน และเรติคิวลิน เป็นต้น โปรตีนเหล่านี้ละลายบ้างในสารละลายเข้มข้นของกรดและเบส (อิ่มเอิบ พันสด, 2006)

4. โปรตีนที่ละลายในด่าง

เป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโนมีสภาพประจุเป็นบวก และมีสภาวะเป็นเบส เกิดจากการที่มีกรดอะมิโนชนิดไลซีน และอาร์จินีน ที่มีคุณสมบัติเป็นเบสอยู่ในโครงสร้างเป็นจำนวนมาก (thaibiotech.info, 2018)

5. ไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (หรือ NPN)

เป็นสารที่มีไนโตรเจนประกอบอยู่ในโครงสร้าง แต่ไม่ใช่โปรตีน เช่น ยูเรีย , ไบยูเรต และแอมโมเนีย แต่สามารถแปลงเป็นโปรตีนได้ด้วยจุลินทรีย์ในสัตว์เคี้ยวเอื้องในกระเพาะอาหาร

2.3 SDS-PAGE

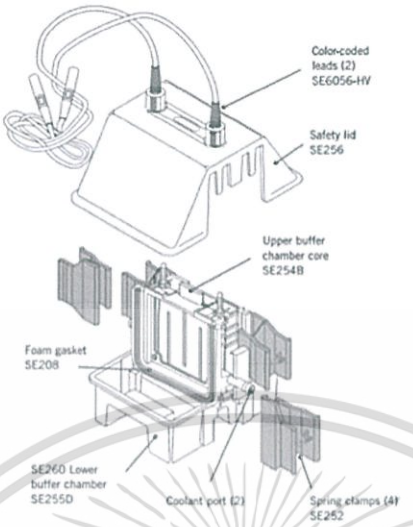
Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวและดูความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยอาศัยการเชื่อมต่อของ acrylamide monomer จนเป็นสายโซ่ยาวประกอบกันเป็นแผ่นเจล โดยมี TEMED เป็น catalyst และมี ammonium persulfate เป็น initiator โปรตีนอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างและประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent โดย SDS จะจับพอลิเพปไทด์ด้วยอัตราส่วน 1.4 กรัม SDS/กรัมโปรตีน โดยมีmercaptoethanol หรือ dithiotreithol เป็น reducing agent เพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide โปรตีนที่จับกับ SDS จะมีประจุลบ เมื่อให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดน้ำหนักโมเลกุลและขนาดของรูพรุนของเจล (โมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก) โดยขนาดของรูพรุนสามารถปรับได้ตามความเข้นข้นของ acrylamide ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น ขนาดของรูพรุนจะเล็กลง นำไปวิเคราะห์ข้อมูล

2.3.1 อุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์รันเจล
2. Power supply
3. ไมโครไปเปต (Micropipette)
4. ขวดสำหรับเตรียมสารเคมี
5. บีกเกอร์ (beaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. กล่องพลาสติกสำหรับย้อมเจล



รูปที่ 2.3.1 ชุดอุปกรณ์รันเจล

ที่มา : Hoefer Pharmacia Biotech Inc., (Model SE250)

2.3.2 สารเคมี

1. Acrylamide
2. Ammonium persulfate
3. Tris base
4. Hydrochloric acid
5. Sodium dodecyl sulfate
6. TEMED (Tetramethylethylenediamine)
7. Glycine
8. DTT (Dithiothreitol)
9. Coomassie Blue R250
10. เอทิลแอลกอฮอล์ 70 %
11. Acetic acid

2.3.3 โปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐาน (protein marker/protein ladder) คือ การนำเอาโปรตีนบริสุทธิ์ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนมาผสมรวมกัน เพื่อใช้ในการบอกน้ำหนักโมเลกุลและติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่สนใจ โดยตัวอย่างของโปรตีนมาตรฐานมีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.1. แอ็คคูโปรตีน ดีเทคเทเบิล (AccuProtein Detectable) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้บอกน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 19.7 kDa ไปจนถึง 114.6 kDa โดยเกิดจากการผสมกันระหว่าง โปรตีนมาร์คเกอร์ที่ไม่ติดสี (unstained protein marker) กับโปรตีนมาร์คเกอร์ที่ติดสี (prestained protein marker) โดยแบนด์โปรตีนที่ติดสีนั้นมีอยู่แบนด์เดียวคือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 24.3 kDa เหมาะสมสำหรับงานวิจัยที่ไม่ต้องติดตามการเคลื่อนที่ของแบนด์โปรตีนระหว่างการรัน ทั้งนี้หลังจากรัน SDS-PAGE เสร็จแล้ว หากนำเจลไปย้อมสี Coomassie หรือย้อม Silver ก็จะทำให้เห็นโปรตีนทุกตัวในผลิตภัณฑ์

2.3.3.2. แอ็คคูโปรตีน พรีสเตน (AccuProtein Prestained) เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนมาร์คเกอร์ที่ใช้บอกน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 19.7 kDa ไปจนถึง 114.6 kDa ซึ่งโปรตีนทุกตัวในผลิตภัณฑ์นี้เป็นโปรตีนที่ย้อมติดสีมาแล้ว เหมาะสำหรับการศึกษาโปรตีนทุกชนิด ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนที่ต้องการติดตามการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำ SDS-PAGE ขณะรัน SDS-PAGE สามารถเห็นสีย้อมที่ติดอยู่บนโปรตีนอย่างชัดเจน

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 องค์ประกอบโปรตีนในกล้ามเนื้อของปลาซาร์ดีน(*Sardinops melanosticta*) และปลาทู (*Pneumatophorus japonicus japonicus*)

Hashimoto และคณะ ได้ทำการสกัดโปรตีนจากกล้ามเนื้อแดง และกล้ามเนื้อขาวของปลาซาร์ดีน *Sardinops melanosticta* ในสภาวะ ก่อน, ระหว่าง, และหลังการเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ และระยะระหว่างการแช่แข็ง โดยนใช้ น้ำกลั่นและตกตะกอนด้วยไตรคลอโรอะซิติก(ซาโครพลาสมิก) โพแทสเซียมคลอไรด์(ไมโอไฟบริลลา), โซเดียมคลอไรด์(โปรตีนที่ละลายในเบส) และ กากที่เหลือส่วนสุดท้ายที่ไม่มีความสามารถในการละลาย(สโตรมา)พบว่า ในกล้ามเนื้อแดงมี ซาร์โครพลาสมิก 23-29%, ไมโอไฟบริลลา 62-66%, โปรตีนที่ละลายในด่าง 6-9%, และ สโตรมา 2-3% และในกล้ามเนื้อขาวมี ซาร์โครพลาสมิก 33-37%, ไมโอไฟบริลลา 54-61%, โปรตีนที่ละลายในด่าง 1-5%, และ สโตรมา 1-2% และเมื่อนำส่วนกล้ามเนื้อแดงเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องสาเซลเซียส ซาร์โครพลาสมิกจะเพิ่มมากขึ้นถึง 37% ขณะที่ไมโอไฟบริลลาจะลดเหลือเพียง 56% ส่วนในกล้ามเนื้อขาวนั้นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และด้วยการวิเคราะห์ด้วย ultracentrifugal analysis ไม่พบพีคของแอคโตไมโอซินในส่วนไมโอไฟบริลลาในกล้ามเนื้อแดง และในโปรตีนที่สกัดจากกล้ามเนื้อขาว ค่าสูงสุดของแอคโตไมโอซิน เกิดขึ้นที่ค่าสัมประสิทธิ์การตกตะกอนที่ 16.0 S ในระยะก่อนการเกร็งตัวและเพิ่มขึ้นเป็น 22.5 S ในระยะหลังการเกร็งตัว และพบผลที่คลายกันนี้ในปลาทู *Pneumatophorus japonicus japonicus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การสกัดโปรตีนจากหนอนนก (*Tenebrio molitor*)

Zhao และคณะ (2016) ได้ทำการทดลองสกัดโปรตีนจากหนอนนก (*Tenebrio molitor*) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปัจจัยที่ใช้ศึกษา คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์, ปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อหนอนนก, อุณหภูมิในการสกัดและเวลาในการสกัด ผลผลิตของโปรตีนสกัด (เปอร์เซ็นต์) จะถูกทำให้แสดงอยู่ในรูปแบบของน้ำหนักเปียก

รายละเอียดวิธีสกัด ดังนี้ นำแมลงมาบดเป็นผงละเอียด นำไปสกัดไขมันและโปรตีนโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีความเข้มข้นระหว่าง 0.1 – 0.5 โมลาร์ ใช้สัดส่วนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อแมลงเท่ากับ 6:1 ถึง 20:1 มิลลิลิตรต่อกรัม อุณหภูมิการสกัด 20 – 80 องศาเซลเซียส และเวลาการสกัด 30 – 120 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ด้วยความเร็ว 3500 g สารละลายจะเกิดการแยกชั้น โดยชั้นล่าง (pellet) เป็นส่วนของไขมัน และชั้นบน (supernatant) เป็นส่วนของโปรตีน แยกส่วนบนและส่วนล่างออกจากกัน นำส่วนบนไปปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความเร็ว 1500 g สารละลายจะเกิดการแยกชั้นอีกครั้ง โดยโปรตีนจะเกิดการตกตะกอนอยู่ที่ชั้นล่าง (pellet) นำส่วน pellet ปรับพีเอชในช่วง 4.3-4.5 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยความเร็ว 2500 g เก็บส่วนตะกอนและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว 2500 g นำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส ค้างคืน (ประมาณ 18 ชั่วโมง) ทำให้แห้งโดยวิธีการแช่เยือกแข็งเพื่อให้ได้สารสกัดโปรตีนสุดท้ายที่มีความชื้นน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองนี้พบว่า วิธีการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ใช้งานได้ดีเมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.25 โมลาร์, ปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อหนอนนกเท่ากับ 15:1 มิลลิลิตรต่อกรัม, อุณหภูมิสกัด 40 องศาเซลเซียสและเวลาการสกัด 60 นาที ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปัจจัยอื่นๆข้างต้น มีผลต่อผลผลิตโปรตีนที่สกัดจากหนอนนก คือ ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่ำเกินไป จะไม่เพียงพอที่จะสกัดโปรตีนออกมาได้อย่างครบถ้วนสมบูรณ์ และแนวโน้มผลผลิตโปรตีนจากการสกัดจะสูงขึ้นเมื่อปริมาณสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงเกินไป จะทำให้ส่วนหนึ่งของโปรตีนที่สกัดได้นั้น ถูกไฮโดรไลซิสและผลผลิตโปรตีนจากการสกัดจะมีปริมาณลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 การปรับปรุงและความสามารถทางเทคนิคของโปรตีนจากหนอนนก *Tenebrio molitor*

Bußler และคณะ (2016) ได้ทำการทดลองทำสกัดโปรตีนจากหนอนนก (*Tenebrio molitor)* โดยศึกษาการกระจายตัวของโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้วิธี SDSPAGE อัตราส่วนที่ใช้คือ 1:10 ใช้บัฟเฟอร์ 0.0125 *M* Tris buffer ที่ pH 6.8, 1% sodium dodecyl sulphate, 10% glycerol, 1% ของ 2-mercaptoethanol และ 0.005% ของ Bromophenol Blue การทำ Denaturation ของโปรตีนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาทีก่อนการวิเคราะห์ อุปกรณ์อิเลคโตรโฟเรสซิสแบบแนวตั้ง ความเข้มของแถบ 5 μl / 10 μl ของตัวอย่างที่แยกจากกันโดยใช้เจล 12% *T* หลังจากการย้อมสีเจลด้วย Coomassie Brilliant blue และ quantification ได้ดำเนินการโดยใช้ Software Analysis

จากผลการทดลองการแยก T. *molitor* proteins ผ่าน SDS-PAGE โดยใช้ 12% running gel พบว่าโปรตีนจาก T. *molitor* ทำให้เกิดแถบโปรตีนที่หลากหลาย โดยพบแถบหลักที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14.3 kDa และ 80.5 kDa มีความเด่นชัดที่ pH 7 สารสกัดโปรตีนประกอบด้วยน้ำหนักโมเลกุลสูง 75.9% (High molecular weight : HMW) และ 24.1% น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight) นอกจากนี้ การลด pH เป็น 2 ทำให้ LMW ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึง 71.5% ขณะที่เพิ่ม pH เป็น 12 เพิ่มขึ้นเป็น 98.9% อาจเป็นไปได้ว่ามีการเสียสภาพด้วยเฮกเซนในสภาวะที่มีค่า pH มาก ในระหว่างการสกัดโปรตีนนำไปสู่การ proteolysis บางส่วนหรือเกือบสมบูรณ์ของ 80.5 kDa ถึง 14.3 kDa หรือต่ำกว่า สำหรับแป้งจาก T. molitor พบกลุ่มโปรตีนหลัก 10 กลุ่ม คือ 13-15 kDa, 15-18 kDa, 18-21 kDa, 21-24 kDa, 24-29 kDa, 30-39 kDa, 40-48 kDa, 48-65 kDa, 67-117 kDa และ 128-250 kDa

โดย Bußler และคณะ (2016) ได้อธิบายว่า แถบในช่วงระหว่าง 14 และ 32 kDa อาจเกิดจากโปรตีนชนิด cuticle ที่มีโมเลกุลน้ำหนักส่วนใหญ่ระหว่าง 14 ถึง 30 kDa (Andersen และคณะ, 1995) หรือโปรตีนชนิด chymotrypsin-like proteinase (24 kDa) (Elpidina และคณะ, 2005) ในขณะที่แถบตั้งแต่ 32 ถึง 95 kDa อาจมาจากเอนไซม์และโปรตีนอื่น ๆ เช่น melanization-inhibiting protein (43 kDa), β-glycosidase (59 kDa) trypsin-like proteinase (59 kDa) และ melanization-engaging types of protein (85 KDa) (Cho และคณะ, 1999, Ferreira และคณะ, 2001, & Prabhakar และคณะ, 2007) และในส่วนของแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล> 95 kDa อาจเป็นได้ที่เชื่อมโยงกับโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกับ vitellogenin โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 160 kDa (Lee และคณะ, 2000) สัดส่วนของโมเลกุลสูงและต่ำได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของตัวทำละลาย, pH และชิ้นส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงในช่วงของ 67-250 kDa พบว่าสารสกัดโปรตีนที่ pH 2 และ 3 คิดเป็นเกือบ 30% ของโปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมด การปรับค่า pH เป็น 2 และ 3 เพิ่มความสามารถในการสกัดชิ้นส่วนโปรตีนในช่วงระหว่าง 40 ถึง 250 กิโลดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

ตั๊กแตนปาทังก้า (*Patanga succuncta*) สั่งซื้อจาก ตลาดคลองเตย

3.1.2 สารเคมี

โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide)

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid)

น้ำกลั่น (Distilled Water)

TCA

Sodium azide

Sulfuric acid

Boric acid

Hydrochloric acid

N,N' – Methylene – Bis

N,N,N,N – Tetramethyl Ethylenediamine (TEMED)

Ammonium Persulfate (APS)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

Tris

กลีเซอรอล (Glycerol)

ไกลซีน (Glycine)

กรดอะซิติก (Glacial Acetic Acid)

Beta – Mercaptoethanol (β – ME)

Bromophenol Blue

เมทธานอล (Methanol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Coomassie Brilliant Blue R-250

Molecular Weight Markers

คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper Sulfate)

โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium Potassium Tartrate)

Bovine Serum Albumin (BSA)

Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องปั่นลดขนาด ชนิดปั่นแห้ง

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge รุ่น Eppendorf 5804R)

ตู้แช่แข็ง (Freezer)

ชุดอุปกรณ์อิเลคโตรโฟเรซีสแบบตั้ง

เครื่องปั่นผสม (Homogenizer)

เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)

ไมโครปิเปต

ตู้ดูดควัน

เครื่องแก้ว

3.3 สถานที่ทำการทดลอง

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตั๊กแตนปาทังก้ามาละลายน้ำแข็ง นำไปปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นลดขนาดชนิดปั่นแห้งด้วยความเร็วปานกลาง เป็นเวลา 5 นาที ชั่งน้ำหนัก 30 กรัม เพื่อนำไปสกัดโปรตีน

3.4.2 ศึกษาชนิดของโปรตีนที่สกัดจากตั๊กแตนปาทังก้า (Hashimoto, 1979)

3.4.2.1 การสกัดโปรตีนโดยใช้น้ำกลั่น

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันออก ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนัก นำไปคนผสมโดยใช้เครื่องกวนผสม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ ทำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วนำส่วนใสมารวมกัน เก็บส่วนตะกอน เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป นำส่วนใสที่รวมกันในตอนแรก มาเติม TCA (tri-chloro acetic acid) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% (w/v) เก็บ ตะกอน(โปรตีน sarcoplasmic) และส่วนใส(Non-Protein Nitrogen) ที่แยกออกจากกัน เพื่อนำไปวิเคราะห์

3.4.2.2 การสกัดโปรตีนโดยใช้โพแทสเซียมคลอไรด์

นำตัวอย่างตะกอนที่เก็บไว้ในตอนแรกจากข้อ 8.4.2.1 ผสมกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 M ในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนัก นำไปคนผสมโดยใช้เครื่องกวนผสม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำส่วนใส (โปรตีน Myofibrillar) มารวมกันเพื่อนำไปวิเคราะห์ และเก็บส่วนตะกอน เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4.2.3 การสกัดโปรตีนโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์

นำตัวอย่างตะกอนจากข้อ 8.4.2.2 ผสมกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 M ในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนัก นำไปคนผสมโดยใช้เครื่องกวนผสม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำส่วนใส (alkali-soluble protein) มารวมกัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ และเก็บส่วนตะกอน(โปรตีน stroma) เพื่อไปวิเคราะห์

นำโปรตีนที่เก็บไว้ทั้ง 5 ส่วน มาวิเคราะห์ดังนี้ ดังนี้

3.4.3. ปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยวิธี เจลดาห์ล (AOAC 2000)

นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ทั้ง 5 ส่วนจากข้อ 8.4.2 มาหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี เจลดาห์ล (AOAC 2000)

3.4.4 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ทั้ง 5 ส่วนจากข้อ 8.4.2 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อย ด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) โดยกำหนดความเข้มข้นของ running gel 10 เปอร์เซ็นต์ และ stacking gel 4 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการสกัดโปรตีนจากตั๊กแตนปาทังก้าด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ

จากการศึกษาทดลองการสกัดโปรตีนจากตั๊กแตนปาทังก้า โดยใช้รีเอเจนต์ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไตรคลอโรอะซิติก เพื่อดูปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากรีเอเจนต์ต่างๆ ความเข้มข้นของรีเอเจนต์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง คือ โพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะได้โปรตีนจากการสกัด 5 ส่วน คือ ส่วนที่สกัดด้วยน้ำ, ส่วนที่สกัดด้วยเกลือ, ส่วนที่สกัดด้วยด่าง, ส่วนที่ตกตะกอนด้วยTCA, และส่วนตะกอนที่เหลือสุดท้ายซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถละลายได้

ตารางที่ 4.1 ผลของรีเอเจนต์ที่มีต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

ชนิดของรีเอเจนต์	ปริมาณร้อยละของโปรตีนที่สกัดได้
น้ำกลั่น	1.4251 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)
กรดไตรคลอโรอะซิติก	6.5979 (กรัมต่อ 100 กรัม)
โพแทสเซียมคลอไรด์	1.3679 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	1.4414 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)
ตะกอนส่วนสุดท้าย	17.7829 (กรัมต่อ 100 กรัม)

จากการสกัดโปรตีนด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ ตามลำดับด้วยน้ำกลั่น, กรดไตรคลอโรอะซิติก, โพแทสเซียมคลอไรด์, โซเดียมไฮดรอกไซด์ และตะกอนที่เหลือเป็นส่วนสุดท้ายซึ่งมีมีความสามารถในการละลาย พบว่าโปรตีนที่ละลายในน้ำ ซึ่งประกอบด้วย ส่วนที่ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก และส่วนน้ำที่ไม่ตกตะกอนมีโปรตีนอยู่ร้อยละ 6.5979 และ 1.4251 ส่วนที่ละลายในสารละลายเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ มีโปรตีนร้อนละ 1.3679 ส่วนที่ละลายในสารละลายด่างโซเดียมคลอไรด์ มีโปรตีนร้อนละ 1.4414 และตะกอนสุดท้ายซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่มีความสามารถในการละลาย มีโปรตีนร้อนละ 17.7829

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของโปรตีนชนิดต่างๆ ที่สกัดจากตั๊กแตนปาทังก้า จากปริมาณโปรตีนทั้งหมด

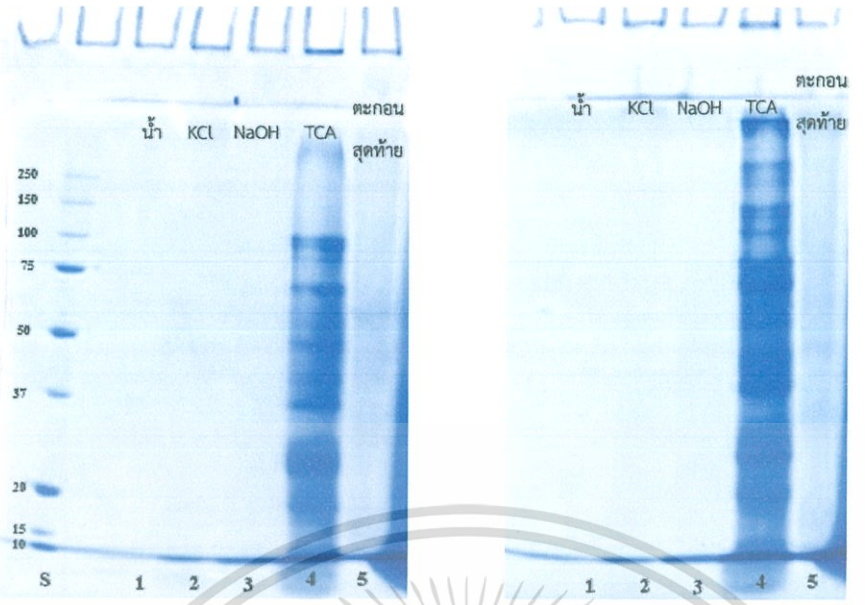
ชนิดของโปรตีน	ร้อยละจากปริมาณโปรตีนทั้งหมด
ละลายในน้ำแต่ไม่ตกตะกอน	29.43
ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก	4.09
โพแทสเซียมคลอไรด	28.25
โซเดียมไฮดรอกไซด์	29.77
ตะกอนส่วนสุดท้าย	8.45

จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นถึงร้อยละของโปรตีนชนิดต่างๆ จากปริมาณโปรตีนทั้งหมด ที่สกัดจากตั๊กแตนปาทังก้า ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนละลายในน้ำแต่ไม่ตกตะกอน, โปรตีนที่ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก, โปรตีนละลายในสารละลายเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์, โปรตีนที่ละลายในสารละลายด่างโซเดียมคลอไรด์ และโปรตีนในตะกอนสุดท้าย พบว่า ปริมาณร้อยละของโปรตีนชนิดต่างๆ เป็นดังนี้ 29.43, 4.09, 28.25, 29.77 และ 8.45 จากปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามลำดับ

4.2 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE

จากการศึกษาทดลองโดยใช้ โปรตีนที่สกัดจากตั๊กแตนปาทังก้าด้วยรีเอเจนต์ที่ต่างกัน นำมาหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยกำหนดความเข้มข้นของ running gel 10 เปอร์เซ็นต์ และ stacking gel 4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการเติม และไม่เติมบีตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) ต่อกับศักย์ไฟฟ้า 40 โวลต์โดยเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิดน้ำหนักโมเลกุลสูง (10-250 กิโลดาลตัน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ผลการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนตั๊กแตนปาทังก้าที่สกัดจากรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ

(รูปซ้ายเติมβ-mercaptoethanol และรูปขวาไม่เติม β-mercaptoethanol)

จากรูปที่ 4.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) ของโปรตีนตั๊กแตนปาทังก้าส่วนต่างๆ คือ โปรตีนละลายในน้ำแต่ไม่ตกตะกอน, โปรตีนที่ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก, โปรตีนละลายในสารละลายเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์, โปรตีนที่ละลายในสารละลายด่างโซเดียมคลอไรด์ และโปรตีนในตะกอนสุดท้าย โดยแถบที่อยู่ด้านบนแสดงถึงโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก ซึ่งจะเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่สั้นกว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ที่เคลื่อนที่ลงมาสู่ด้านล่างและเกิดแถบทึบขึ้น อย่างไรก็ตามในการทดลองพบแถบสีในโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกเพียงแถบเดียว ส่วนในแถบโปรตีนอื่นๆ นั้นไม่พบแถบสี การที่เป็นเช่นนี้เกิดจาก โปรตีนเหล่านี้อยู่ในรูปของสารละลาย ซึ่งอาจมีความเข้มข้นไม่เพียงพอ จำเป็นต้องผ่านการทำให้เข้มข้นก่อนนำมารันเจล ในขณะที่โปรตีนที่ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก พบว่าแผ่นเจลที่โปรตีนเติม reducing agent ลงไป เมื่อทำการรันเจลแล้วจะพบโมเลกุลโปรตีนขนาดเล็กมากกว่าแผ่นเจลที่ไม่ได้เติม reducing agent ลงในโปรตีน ซึ่งแผ่นเจลที่เติม reducing agent ลงในโปรตีน ประกอบด้วยหน่วยย่อยกลุ่มใหญ่ๆ ขนาดดังนี้ 20-15 kD, 30-20kD, 37-30kD, 50-45kD และ 70-60kD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษาการสกัดโปรตีนในตั๊กแตนปาทังก้าด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ ตามลำดับขั้นตอนพบว่าร้อยละของโปรตีนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนที่ละลายน้ำแต่ไม่ตกตะกอน, โปรตีนที่ละลายน้ำและสามารถตกตะกอนได้ด้วย TCA, โปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ, โปรตีนที่ละลายในสารละลายด่าง และโปรตีนในตะกอนสุดท้ายที่ไม่มีความสามารถในการละลาย เป็นดังนี้ 1.4251, 6.5979, 1.3679, 1.4414 และ17.7829 ตามลำดับและเมื่อนำปริมาณโปรตีนมาส่วนต่างๆมาคำนวณหาอัตราส่วนร้อยละของปริมาณโปรตีนชนิดต่างๆ ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดพบว่า โปรตีนที่ละลายน้ำแต่ไม่ตกตะกอน, โปรตีนที่ละลายน้ำและสามารถตกตะกอนได้ด้วย TCA, โปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ, โปรตีนที่ละลายในสารละลายด่าง และโปรตีนในตะกอนสุดท้ายที่ไม่มีความสามารถในการละลายมีอัตราส่วนร้อยละ 29.43, 4.09, 28.25, 29.77 และ 8.45 จากปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามลำดับ

การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ของโปรตีนตั๊กแตนปาทังก้าส่วนต่างๆ คือ โปรตีนละลายในน้ำแต่ไม่ตกตะกอน, โปรตีนที่ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก, โปรตีนละลายในสารละลายเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์, โปรตีนที่ละลายในสารละลายด่างโซเดียมคลอไรด์ และโปรตีนในตะกอนสุดท้าย พบว่าแผ่นเจลที่โปรตีนเติม reducing agent ลงไป ประกอบด้วยหน่วยย่อยกลุ่มใหญ่ๆ ขนาดดังนี้ 20-15 kD, 30-20kD, 37-30kD, 50-45kD และ 70-60kD

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำตัวอย่างที่สกัดไปทำให้เข้มข้น หรือทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ก่อนนำมาตรวจสอบหาองค์ประกอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

Hashimoto, K., Watabe, S., Kono, M. and Skiro, K. (1979). Muscle protein composition of sardine and mackerel. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 45: 1435-1441

Zhao, X., Vázquez-Gutiérrez, J.L., Johansson, D.P., Landberg, R. and Langton, M. (2016). Yellow Mealworm Protein for Food Purposes - Extraction and Functional Properties. PLoS ONE 11(2): e0147791.

Bußler, S., Rumpold, B. A., Jander, E., Rawel, H. M., and Schlüter, O. K. (2016). Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (Tenebrio molitor) and black soldier fly (Hermetia illucens) larvae. Heliyon, 2(12), e00218.

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช. 2545. แมลงกินได้ที่พบในเดือนกรกฎาคม. (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.dnp.go.th/FOREMIC/Entomology/Web/Eminent/Eminent/Edibleins/Edibleins_Jul/Edibleins_Jul.htm. (20 พฤศจิกายน 2561)

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549. เคมีอาหาร.พิมพ์ครั้งที่ 2. โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮาส์.

Grandison,A.2001. Food protein:processing and functionality เอกสารการฝึกอบรมเรื่อง Food Protein. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Enzmart Biotech. 2559. SDS-PAGE. (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://enzmart.com/sds.php. (25 มิถุนายน 2561)

อิ่มเอิบ พันธ์สด. 2549. เทคโนโลยีเนื้อและผลิตภัณฑ์. (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://elearning.nsru.ac.th/web_elearning/meattech/lesson/less3_3.html. (25 มิถุนายน 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม โดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2000)

1. วัสดุอุปกรณ์

1. ขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl Apparatus)
2. เครื่องย่อย (Digestion Apparatus)
3. เครื่องกลั่น (Distallation)
4. ขาตั้งและบิวเรตสำหรับไทเทรตสารละลาย
5. ขวดรูปชมพู่ ขนาด (Erlenmeyer flask) 250 มิลลิลิตร
6. กระบอกตวงขนาด 25, 100 และ 300 มิลลิลิตร
7. น้ำกลั่น
8. บีกเกอร์
9. glass bead or boiling chip
10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

2. สารเคมี

1. Conc. Sulfuric acid
2. Mix Catalyst (สารผสมระหว่าง copper sulfate: potassium sulfate อัตราส่วน 1:10)
3. Sodium hydroxide เข้มข้นร้อยละ 40
4. Sodium hydroxide เข้มข้นร้อยละ 15
5. Hydrochloric เข้มข้น 0.1 N
6. Boric acid เข้มข้นร้อยละ 2
7. Indicator

3. วิธีการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ชั่งตัวอย่าง 1-5 กรัม ใส่ลงใน Kjeldalh flask เติม Mixed catalyst: CuSO4 0.1 กรัม และ conc.H_2SO_4 25 มิลลิลิตร

2. ย่อยบน heating mantle โดยให้ความร้อนอ่อนๆจนกระทั่งหมดฟองแล้วค่อยๆ เพิ่มความร้อนขึ้นเรื่อยๆ จนถึงอุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น

3. เติม 40% NaOH 40-50 ml

5. นำ receiving flask ที่มี 2% boric acid อยู่ 50 มิลลิลิตร และเติม indicator เรียบร้อยแล้วมารองรับสารละลายที่กลั่นได้

6. กลั่นจนได้สารละลายประมาณ 25 ml

7. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N HCl จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมชมพู

8. ทำ blank ตามข้อ 1-7 โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

9. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = (A-B)\times N\times 1.4\times F\ Wt$$

A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

Wt คือ น้ำหนักของตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)

F คือค่าแฟคเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) (Laemmli 1970)

1. สารเคมี

1. Tris (Hydroxyl methyl aminomethane : $C_4H_{11}NO_3$)
2. Sodium Dodecyl Sulfate
3. Glycine ($C_2H_5NO_2$)
4. Methanol (CH_3OH)
5. Gacial Acetic Acid (CH_3COOH)
6. Coomassie Briliant Blue R250
7. Hydrochloric acid (HCl)
8. Glycerol ($C_3H_8O_3$)
9. 2-mercaptoethanol (2-ME)
10. Bromophenol blue
11. Acrylamide
12. Bis-acrylamide
13. Ammonium persulfate
14. TEMED
15. Protein marker

2. สูตรของสารละลายที่ใช้ใน SDS-PAGE

2.1 สารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer solution, Electrode buffer)

25 mM Tris	ชั่ง	3.0825	กรัม
0.1% SDS	ชั่ง	1.00	กรัม
192 Glycine	ชั่ง	14.4134	กรัม
Distilated water	ปรับปริมาตรรวมเป็น	1000	มิลลิลิตร

2.2 Fixing solution

50% Methanol	ตวง	500	มิลลิลิตร
40% Distilated water	ตวง	400	มิลลิลิตร
10% Gacial Acetic Acid	ตวง	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 Staining solution

Coomassie Brilliant Blue R250	ชั่ง	0.5	กรัม
Methanol	ตวง	150	มิลลิลิตร
Gacial Acetic Acid	ตวง	50	มิลลิลิตร
Distilated water	ปรับปริมาตรรวมเป็น	1000	มิลลิลิตร

2.4 Destaining solution

30% Methanol	ตวง	300	มิลลิลิตร
60% Distilated water	ตวง	600	มิลลิลิตร
10% Gacial Acetic Acid	ตวง	100	มิลลิลิตร

2.5 Sample buffer (SDS reducing)

Tris-HCl 0.5M pH 6.8	ตวง	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	ตวง	4.0	มิลลิลิตร
Glycerol	ตวง	2.0	มิลลิลิตร
B-mercaptoethanol	ตวง	1.0	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	ชั่ง	0.03	กรัม
Distilated water	ปรับปริมาตรรวมเป็น	10.0	มิลลิลิตร

กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในตู้แช่แข็ง

2.6 Sample buffer (SDS non-reducing)

Tris-HCl 0.5M pH 6.8	ตวง	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	ตวง	4.0	มิลลิลิตร
Glycerol	ตวง	2.0	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	ชั่ง	0.03	กรัม
Distilated water	ปรับปริมาตรรวมเป็น	10.0	มิลลิลิตร

2.7 30% Acrylamide solution

Acrylamide	ชั่ง	29.2	กรัม
Bis-Acrylamide	ชั่ง	0.8	กรัม

2.8 10% Ammonium persulfate

Ammonium persulfate	ชั่ง	1.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Distilated water	ปรับปริมาตรรวมเป็น	10.0	มิลลิลิตร

3. สูตรการเตรียมเจล (Gel separation)

3.1 Running gel (10%)

30% Acrylamide	5.00	มิลลิลิตร
Tris-HCl 1.5M pH8.8	3.75	มิลลิลิตร
Distillated water	5.95	มิลลิลิตร
10% SDS	150	ไมโครลิตร
10% APS	75	ไมโครลิตร
TEMED	7.5	ไมโครลิตร
Total	15	มิลลิลิตร

3.2 Stacking gel (4%)

30% Acrylamide	1.00	มิลลิลิตร
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.875	มิลลิลิตร
Distillated water	4.5	มิลลิลิตร
10% SDS	75	ไมโครลิตร
10% APS	37.5	ไมโครลิตร
TEMED	4.5	ไมโครลิตร
Total	7.5	มิลลิลิตร

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

นำโปรตีนตัวอย่างมาละลายใน 10 mM Tris-HCl pH 6.8 ซึ่งประกอบด้วย 2.5% SDS, 1% B-mercaptoethanol, 2.5% Glycerol และ 0.01% Bromophenol blue ให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีน 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที (

4.2 การเตรียมเจล

1. เช็ดกระจกด้วยแอลกอฮอล์ 70% จากด้านล่างขึ้นด้านบน
2. วางยางรองที่ช่องที่กำหนด
3. หนีบด้วย clip ให้แนบสนิท ขอบเสมอกันทุกด้าน
4. เติม running gel ให้มีระดับความสูง 7.5 เซนติเมตร วัดจากยางรอง โดยห้ามทำให้เกิดฟอง
5. หยดน้ำกลั่นปิดที่บริเวณผิวหน้าเจลให้เต็ม
6. พักทิ้งไว้ 45 – 60 นาที เพื่อรอให้เจลเซทตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เมื่อครบเวลาที่กำหนด น้ำกลั่นออกและซับน้ำออกให้มากที่สุด
8. เติม stacking gel ให้ถึงขอบกระจก ห้ามทำให้เกิดฟอง เสียบ comb ทันที
9. พักทิ้งไว้ 45 – 60 นาที เพื่อรอให้เจลเซทตัว

4.3 การโหลดตัวอย่าง

1. เติม electrode buffer ลงใน chamber
2. ดึง clip ที่หนีบกระจกที่ใช้ในการเตรียมเจลออก และแกะยางรองกระจกออก
3. หย่อน plate ลงใน chamber ทั้ง 2 ด้าน ห้ามทำให้เกิดฟอง
4. ใส่แผ่นกั้นลงใน chamber ทั้ง 2 ด้าน
5. ดึง comb ออก ระวังอย่าให้เจลขาด
6. เติม electrode buffer ให้เต็ม chamber
7. โหลดตัวอย่างลงในช่อง ช่องละ 10 ไมโครลิตร
8. ต่อกระแสไฟฟ้า 20 mA ต่อ 1 แผ่นเจล
9. รอให้ตัวอย่างเคลื่อนที่ลงมาที่ขอบล่างของเจล
10. หยุดกระแสไฟฟ้าและถอดแผ่นเจลออก

4.4 การย้อมสีแผ่นเจล

1. แกะเจลออกจากแผ่นกระจก ระวังอย่าให้เจลขาด
2. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย
3. แช่ใน fixing solution เป็นเวลา 10 นาที โดยวางบนเครื่อง shaking
4. เมื่อครบเวลา นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกลิ่น Gacial Acetic Acid
5. แช่ใน staining solution ข้ามคืน โดยวางบนเครื่อง shaking
6. นำเจลที่ผ่านการแช่ staining solution ข้ามคืน มาแช่ลงใน destaining solution
7. เปลี่ยนน้ำ destaining ทุกๆ 10 นาที จนขอบแผ่นเจลใส

4.5 การตรึงเจล

1. ตัดกระดาษให้ใหญ่กว่าแผ่นกระจกที่ใช้ในการตรึงเจล ด้านละ 1 นิ้ว
2. นำกระดาษแก้วแช่น้ำให้อ่อนตัว
3. วางกระดาษแก้วลงบนกระดาษ ไล่ฟองอากาศออกจนหมด
4. วางแผ่นเจลลงบนกระจก
5. หยด 20% Glycerol ลงบนแผ่นเจลให้ทั่ว
6. นำกระดาษแก้วอีกแผ่นแช่น้ำ และวางทับลงบนแผ่นเจล ไล่ฟองอากาศออกจนหมด
7. ใช้ clip หนีบที่มุมทั้ง 4 ด้าน
8. หยด 20% Glycerol ลงบนแผ่นเจลให้ทั่ว
9. วางทิ้งไว้จนกว่าแผ่นเจลจะแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวฐิตินันท์ ยุทธวรวิทย์
วัน เดือน ปีเกิด	4 ตุลาคม พ.ศ. 2538
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2542 ได้เข้ารับการศึกษาระดับชั้นอนุบาลจาก โรงเรียนหัวหินวิทยาลัย
	ปีการศึกษา 2545 ได้เข้ารับการศึกษาระดับชั้นประถมศึกษาจาก โรงเรียนหัวหินวิทยาลัย
	ปีการศึกษา 2551 ได้เข้ารับการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาจาก โรงเรียนหัวหินวิทยาลัย
	ปีการศึกษา 2558 ได้เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร (วิทยาศาสตรบัณฑิต) ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	ผ่านการฝึกงาน ณ คณะไบโอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติผิงตง ประเทศไต้หวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้