ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง การย่อยสลายโปรตีนจากเลือดและขนสัตว์

(Protein hydrolysate from Blood and Feather)

โดย นางสาวพรพิมล บุญญอัศดร ระหัสประจำตัว 28-4395

นางสาวรักชนก ตันสกุล ระหัสประจำตัว 28-4399

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก ...

...ลงชื่อ... ..๑๕./..มี.ค./๓๒.. อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(นายกิตติพงษ์ ห่วงรักษ์)

...ลงชื่อ... ..๒๗./..มี.ค./..๓๒.. อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมปัญหาพิเศษ

(ม.ร.ว.ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์)

....ลงชื่อ..... ..๒๘./..มี.ค./๓๒.. กรรมการของภาควิชา

นางสาวเยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิฐ์

....ลงชื่อ..... ..๒๙./..มี.ค./๓๒.. กรรมการของภาควิชา

(นางอนงค์ วรอุไร)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

...ลงชื่อ... ๒๙ มี.ค. ๒๕๓๒

(นายกิตติพงษ์ ห่วงรักษ์)

รักษาการแทนหัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ ๒๙ เดือน ..มี.ค..... พ.ศ. ๒๕๓๒

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13692

ปัญหาพิเศษ (45499)

เรื่อง

การย่อยสลายโปรตีนจากเลือดและขนสัตว์

(Protein Hydrolysate from Blood and Feather)

T096994

โดย

นางสาวพรพิมล บุญญอัศดร
นางสาวรักชนก ตันสกุล

เสนอ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

พ.ศ. 2532

ปฟ.
W249ก
2532
แขหมู่.....
เลขทะเบียน.....96994
วัน.เดือน.ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ทั้งนี้ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

เรื่อง

การย่อยสลายโปรตีนจากเลือดและขนสัตว์

(Protein Hydrolysate from Blood and Feather)

ศึกษาการวิเคราะห์การย่อยสลายโปรตีนจากเลือดปลา เลือดหมู เลือดไก่ และ ขนไก่ โดยวิธีต้มกับกรด และ ด่าง ในเวลาต่าง ๆ คือ 15,20,24 และ 30 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า การย่อยสลายด้วยวิธีกรด และ ด่าง เมื่อนำโปรตีนที่ย่อยสลายแล้วมาทดสอบด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์ (Biuret Test) พบว่าการใช้เวลาต่างกันไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาณพันธะเป็ปไทด์ที่ได้ จึงใช้เวลา 15 ชั่วโมง ก็เพียงพอ เมื่อนำตัวอย่างหลังจากการย่อยสลายด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะมิโนแอซิค อะนาไลเซอร์ (Amino Acid Analyzer) พบว่าขนไก่ เลือดปลา เลือดหมู และเลือดไก่ มีร้อยละของกรดอะมิโนเรียงตามปริมาณจากมากไปน้อย คือ ซีรีน (Serine) 13.69 ลูซีน (Leucine) 12.89 กลูตามิค แอซิค (Glutamic Acid) 12.04 ลูซีน (Leucine) 12.03 ตามลำดับ โปรตีนจากขนไก่สามารถถูกย่อยสลายได้มากที่สุด การย่อยสลายด้วยกรดจะทำลายกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophane) ส่วนวิธีด่างเมื่อทดสอบด้วยวิธี เออร์ริค เทสท์ (Erlich Reaction) พบว่ากรดอะมิโนทริปโตเฟนไม่ถูกทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์ อาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ท่านช่วยกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ รวมทั้งให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่าง ๆ และความช่วยเหลืออนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง อะมิโน แอซิด อะนาไลเซอร์ (Amino Acid Analyzer) อีกทั้งสารเคมีในการวิเคราะห์ต่าง ๆ นอกจากนี้ ขอขอบพระคุณ อาจารย์กิตติพงษ์ ห่วงรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ อาจารย์เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ รวมทั้งอาจารย์ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน อาจารย์นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์ และ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ช่วยให้คำปรึกษาและ แนะนำข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ ในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ จนทำให้ปัญหาพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ คณะผู้จัดทำต้องขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ เพื่อน ๆ ที่ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจ ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

พรพิมล บุญญอัศดร
รักชนก ตันสกุล
มีนาคม 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
คำนิยม	(2)
สารบาญ	(3)
สารบาญตาราง	(4)
สารบาญภาพ	(6)
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	18
ผลการทดลองและวิจารณ์	23
สรุปผลการทดลอง	32
ข้อเสนอแนะ	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และขนไก่ ก่อนการย่อยสลาย.....	23
2	ผลการวิเคราะห์ ปริมาณพันธะเปปไทด์ด้วย วิธีไบยูเร็ต ของตัวอย่างที่ย่อยสลาย ด้วยวิธีกรดและด่างเมื่อเวลาต่าง ๆ กัน.....	26
3	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนของเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และขนไก่ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรด ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.....	29
4	แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่ย่อยสลายได้ เมื่อใช้ย่อยด้วยสภาวะกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer.....	30

ภาคผนวก

ข.1	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสง ของโปรตีนมาตรฐาน BSA.....	42
ข.2	ผลการวิเคราะห์ปริมาณพันธะเปปไทด์ด้วยวิธีไบยูเร็ต ของตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยวิธีกรดและด่างที่เวลาต่าง ๆ กันที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร.....	45
ง.3	แสดงการวิเคราะห์ Varience โดยวิธี One Tail.....	51
ง.4	Analysis of Varience ของความชื้นของเลือดไก่ เลือดปลา เลือดหมู และขนไก่ ก่อนทำการย่อยสลาย.....	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก หน้า

ง.5	Analysis of Varience ของโปรตีนของเลือดเลือดไก่ เลือดปลา เลือดหมู และขนไก่ ก่อนทำการย่อยสลาย.....	52
ง.6	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดไก่ ที่ย่อยสลายด้วยวิธีกรด ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเร็ต.....	53
ง.7	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดปลาที่ย่อยสลายด้วยวิธีกรดที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยวิเคราะห์ด้วย วิธีไบยูเร็ต.....	53
ง.8	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดหมู ที่ย่อยสลายด้วยวิธีกรด ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเร็ต.....	54
ง.9	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของขนไก่ที่ย่อยสลายด้วย วิธีกรด ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเร็ต.....	54
ง.10	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดไก่ ที่ย่อยสลายด้วยวิธีด่าง ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเร็ต.....	55
ง.11	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดปลาที่ย่อยสลายด้วยวิธีด่าง ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเร็ต.....	55
ง.12	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดหมู ที่ย่อยสลายด้วยวิธีด่าง ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเร็ต.....	56
ง.13	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของขนไก่ ที่ย่อยสลายด้วยวิธีด่าง ที่เวลาต่าง ๆ กันโดยวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเร็ต.....	56
จ	สูตรเคมีและโครงสร้างของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ.....	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กราฟแสดงการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริค ที่ความเข้มข้นต่าง.....	9
2	กราฟแสดงการย่อยสลายด้วยด่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	10
3	กราฟแสดงการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ.....	10
4	ผลการวิเคราะห์จากเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน.....	13
5	ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย เครื่อง Amino Acid Analyzer.....	27
6	การ Spot กรดอะมิโนทริปโตเฟน ที่มีในตัวอย่างหลังการย่อยสลายด้วยด่าง โดยทำปฏิกริยากับสาร Dimethyl Amino Benzaldehyde ได้สารสีม่วงแดงเกิดขึ้น.....	31

ภาพภาคผนวก

ข.1	กราฟแสดงกราฟมาตราฐานของโปรตีน Bovine Albumin.....	43
ข.2	โครงสร้างโปรตีน Bovine Albumin.....	44
ค.3	ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer ของเลือดหมูเมื่อย่อยด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	46
ค.4	ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzerของเลือดปลาเมื่อย่อยด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	47
ค.5	ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer ของเลือดไก่เมื่อย่อยด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพภาคผนวก หน้า

ค.6 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer ของขนไก่เมื่อย่อยด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง..... 49

ง.7 เครื่องปั่น (Blender) แยกเม็ดเลือดที่แข็งตัวให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน..... 61

ง.8 การตกตะกอนโปรตีนทั้งหมดในเลือดด้วย อะซิโตน (Acetone)..... 62

ง.9 เครื่องย่อยสลายโปรตีน..... 63

ง.10 เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (Rotary Evaporator)..... 64

ง.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Visible Spectophotometer)..... 65

ง.12 เลือดไก่ เลือดปลา เลือดหมูหลังอบแห้งและบดละเอียดแล้ว และขนไก่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำมาทำการย่อยสลาย..... 66

ง.13 ตัวอย่างเลือดและขนไก่ภายหลังการย่อยสลายด้วยวิธีกรดเก็บในขวดแก้วเก็บในที่เย็น..... 67

ง.14 ตัวอย่างเลือดและขนไก่ภายหลังการย่อยสลายด้วยวิธีด่างเก็บในหลอดแก้วไว้ในที่เย็น..... 68

ง.15 ตัวอย่างเลือดและขนไก่นำมาทำปฏิกริยา กับสารละลายไบยูเรท ทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง..... 69

ง.16 ตัวอย่างเลือดและขนไก่ภายหลังการย่อยสลายด้วยวิธีกรด และ ด่าง นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเร็ตตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง..... 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยสลายโปรตีนจากเลือดและขนสัตว์

(Protein Hydrolysate from Blood and Feather)

บทนำ

ในปัจจุบันนี้ภาวะการขาดแคลนอาหารเป็นปัญหาที่สำคัญ ดังนั้นจึงมีการแสวงหาอาหารจากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งจะได้มาจากการนำของเสียกลับมาใช้ประโยชน์หรือได้จากของเหลือทิ้ง แหล่งอาหารที่สำคัญที่เรามักมองข้ามไปอีกอย่าง และนับว่าเป็นแหล่งที่มีค่าทางอาหารสูง คือ การใช้ประโยชน์หรือผลพลอยได้ที่ได้จากสัตว์ เช่น เลือดและขนสัตว์ ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ โดยมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ได้เคยมีผู้ศึกษาใช้เลือดเป็นอาหารสัตว์ พบว่าสัตว์สามารถย่อยสลายเลือด และนำกรดอะมิโนมาใช้ประโยชน์แก่ร่างกายได้เพียงร้อยละ 20 เท่านั้น การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ เพื่อนำกรดอะมิโนมาใช้ประโยชน์ต้องใช้ภาวะที่รุนแรง เช่น ใช้กรดหรือด่างและความร้อนสูงเป็นเวลานาน จึงได้มีผู้ทดลองย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในเลือดและขนสัตว์ก่อนนำไปใช้เป็นอาหารเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างจริงจัง การสลายพันธะอาจจะทำได้โดยใช้การต้มในหม้อนึ่งความดันที่ความดันสูง หรือย่อยสลายด้วยสารเคมีซึ่งอาจจะเป็นกรด,ด่าง หรือเอมไซม์ จะได้กรดอะมิโนซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางอื่นได้ง่าย

โปรตีนเป็นสารประกอบสำคัญที่ร่างกายจะสามารถนำไปใช้พัฒนาโครงสร้างและการเจริญเติบโตของร่างกาย ซึ่งโปรตีนที่ดีจะต้องย่อยง่าย และนำไปใช้ประโยชน์ต่อร่างกายได้เต็มที่ รวมทั้งมีกรดอะมิโนเพียงพอและสมดุล สำหรับร่างกายของคนหรือสัตว์แต่ละชนิด ในปี ค.ศ. 1960 ได้มีการทดลองย่อยสลายโปรตีนจากของเหลือใช้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งส่วนมากมักจะใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์มากกว่าในอาหารคน

เลือดและขนสัตว์เป็นผลพลอยได้ที่ได้จากโรงงานฆ่าสัตว์ ซึ่งมีผู้เห็นความสำคัญน้อยมากควรที่จะมีการนำมาใช้ประโยชน์มากขึ้น เพื่อเป็นการพัฒนาแหล่งโปรตีนใหม่ ๆ นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในการเพิ่มแนวทางการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้เพิ่มขึ้นอีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์ของการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ เพื่อศึกษาหาวิธีวิเคราะห์ และสภาวะที่เหมาะสม ในการย่อยสลายโปรตีนจากเลือด และขนสัตว์ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่น โดยจะศึกษาถึงวิธีรวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเลือดและขนสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

1. วัตถุดิบ

ก. เลือด

เลือด (Blood) เป็นส่วนที่มีเหลืออยู่เป็นจำนวนมากหลังการฆ่าสัตว์ ประกอบด้วยโปรตีนค่อนข้างสูง ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับเนื้อแดง บางครั้งอาจเรียกว่า "Liquid meat" เลือดมีสัดส่วนในร่างกายร้อยละ 10-15 โดยน้ำหนัก เช่น ในวัวมีน้ำหนักตัว 500 กิโลกรัม มีเลือดถึง 10-12 ลิตร (2.25 แกลลอน) สุกรที่มีน้ำหนักตัว 90-100 กิโลกรัม มีเลือด 2.25 ลิตร (0.5 แกลลอน) (เยาวลักษณ์, 2530)

เลือดส่วนใหญ่ถูกนำไปทำให้แห้ง และบดละเอียดเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ หรือบุ๋ย ซึ่งยังไม่เป็นการใช้ประโยชน์จากเลือดเท่าที่ควร แม้ว่าในเลือดจะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายสูง

ก.1 องค์ประกอบของเลือด

เลือดประกอบด้วยพลาสม่า (Plasma) หรือน้ำเลือด (Serum) ที่มีสีเหลืองซีด ร้อยละ 60 ซึ่งในพลาสม่ามีโปรตีนร้อยละ 7 และส่วนของเม็ดเลือดแดง (Red cell Fraction) ซึ่งมีสีแดงออกชมพูเข้มมีอยู่ร้อยละ 35 เซลของเม็ดเลือดแดง (Erythrocytes) มีฮีโมโกลบิน (Haemoglobin) เป็นรงควัตถุสำหรับขนส่งออกซิเจนไปสู่เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ

ก.2 การปฏิบัติการที่เหมาะสมในการเก็บเลือดในโรงฆ่าสัตว์

เลือดเป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่ายมาก (Highly labile material) ถ้าการปฏิบัติในการขนย้ายไม่ดี จะทำให้เลือดเกิดการเน่าเสียและไม่เหมาะแก่การนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร การเก็บเลือดที่ปฏิบัติกันในโรงฆ่าสัตว์ จะทำโดยการใช้ภาชนะบรรจุที่เหมาะสมรองไว้ใต้คอของสัตว์ในขณะที่จะเชือดคอ การเก็บเลือดสดโดยวิธีนี้ จะมีการปนเปื้อนตลอดเวลา การฆ่าที่ถูกต้องทำได้โดยใช้มีดที่มีรูกลวงอยู่ภายใน (Hollow sticking knife) แทงคอ เลือดจะผ่านท่อพลาสติกลงสู่ภาชนะที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเลือดจะถูกตรวจสอบโดยสัตวแพทย์ก่อนนำไปทำผลิตภัณฑ์อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือดเมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการรวมกัน (Coagulation) ทำให้แข็งตัวเป็นก้อน (Clot) ซึ่งสามารถป้องกันได้โดยใช้ สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant) เช่น การใช้สารโซเดียมซิเตรท (Sodium Citrate) ร้อยละ 1.5 เติมลงในเลือดสดแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า พบว่าสามารถเก็บเลือดไว้ในสภาพของ ของเหลวได้นานถึง 48 ชั่วโมง แต่เลือดอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นขึ้น เนื่องจากสารประกอบประเภทไขมันที่มีอยู่ในเลือดถูกออกซิไดซ์ทำให้เกิดกลิ่นคล้ายปลา (Fishy flavour)

ก.3 การแปรรูปเลือดในปัจจุบัน

การแปรรูปเลือดในปัจจุบันทำได้ 2 วิธีคือ

ก.3.1 การระเหยน้ำออกเพื่อทำให้เลือดแห้งโดยใช้ท่อพ่นไอน้ำ (Steam Jacket Vessel) หรือใช้การพ่นไอน้ำโดยตรง (Direct Injection of Steam) ซึ่งจะทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อน จึงจะนำไปทำให้แห้งต่อไป ไม่ควรปล่อยให้เลือดสัมผัสอากาศเป็นเวลานานที่ 80 องศาเซลเซียส เนื่องจากจะไปทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง โดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งจะเกิดการสูญเสียได้เมื่อสัมผัสกับความร้อนเป็นเวลานาน เลือดแห้งที่ได้สามารถใช้แทนเลือดสดในการทำผลิตภัณฑ์อาหารได้ เช่น เป็นตัวสเตบิไลซ์เซอร์ (Stabilizer) ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (เยาวลักษณ์ , 2530)

ก.3.2 การปั่นแยกส่วนของเม็ดเลือดแดงออกจากพลาสมา สามารถทำได้โดยใช้เครื่องปั่นแยก (Centrifuge) ที่ออกแบบโดยเฉพาะเพื่อลดการทำลายเซลของเม็ดเลือดแดงไม่ให้แตก (Haemolysis) ในขณะถูกแรงเหวี่ยง หรือโดยการใช้ Ultra Filtration ที่ใช้เมมเบรนที่เหมาะสม ส่วนของพลาสมาที่ถูกแยกเม็ดเลือดแดงออกแล้วอาจนำไปใช้ใน ผลิตภัณฑ์โดยตรง หรือผ่านเข้าเครื่องทำแห้งชนิดผงที่อุณหภูมิต่ำ (Low Temperature Spray Drying) จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีครีม และมีโปรตีนอยู่มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งมักจะนำไปเติมในอาหารเพื่อเพิ่มเนื้อ (Yield) ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

สำหรับส่วนของเม็ดเลือดแดง เมื่อนำไปทำให้แห้งจะได้เป็นผงสีดำแดงและนำไปใช้เติมในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป สำหรับสีของเลือดผงอาจทำให้สีอ่อนลงโดยการแยกส่วนของฮีม (Heam) ในเม็ดเลือดออกในสภาวะที่ไม่ทำให้ส่วนของโปรตีนฮีโมโกลบินถูกทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.4 การตกตะกอนโปรตีนของเลือด

เนื่องจากเลือดประกอบด้วยเซลเม็ดเลือดแดงและพลาสม่า ทั้งเม็ดเลือดแดง และพลาสม่าต่างก็มีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นในการตกตะกอนโปรตีนของเลือด โปรตีนส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในเลือดหรือซีรัมจะตกตะกอนเกือบหมด (อมรินทร์และคณะ , 2529) ตะกอนที่เกิดขึ้นนี้อาจแยกออกมาจากสารละลาย ได้โดยการกรองหรือปั่นแยกในเครื่องปั่น วิธีการตกตะกอนอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี เช่น กรดหรือเกลือของโลหะหนัก กรดที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนได้แก่ TCA (Trichloroacetic Acid) กรดทังสติค (Tungstic Acid) และกรดพิคริค (Picric Acid) เป็นต้น ส่วนเกลือของโลหะหนักที่ใช้ตกตะกอนโปรตีนได้แก่ เกลือของสังกะสี ทองแดง เหล็ก และปรอท นอกจากนี้ยังอาจใช้ Miscible Solvent เช่น อะซิโตน (Acetone) เมทานอล (Methanol) และเอทานอล (Ethanol) หรือโดยการกรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองใส (Dialyzing Membrane) ด้วยการไดอะไลซ์ (Dialyze) ซึ่งแผ่นเยื่อบางนี้จะยอมให้อนุภาคขนาดเล็กผ่านเท่านั้น และจะกั้นไม่ให้โปรตีนผ่านไปได้

ข. ขนสัตว์

ขนสัตว์ถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมน้อยมาก การใช้ประโยชน์ส่วนมากจะใช้ในการทำหมอน ที่นอน ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์ได้ไม่เต็มที่ ต่อมาจึงได้มีการพัฒนา นำขนสัตว์มาทำเป็นอาหารสัตว์และพบว่าขนสัตว์เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ และมีปริมาณสูง ขนสัตว์ส่วนมากที่นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ มักเป็นขนไก่ และขนเป็ด เพราะหาง่ายและต้นทุนต่ำ โดยนำมาผ่านกรรมวิธีให้ความร้อนภายใต้ความดัน โปรตีนจะถูกย่อยสลายบางส่วน ทำให้สัตว์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น

ข.1 องค์ประกอบของขนสัตว์

ขนสัตว์โดยเฉพาะขนเป็ด และขนไก่ประกอบด้วยโปรตีน พวกคีราติน (Keratin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างโมเลกุลสลับซับซ้อนและพบว่ามีกรดอะมิโนซีสตีน (Cystein) ในปริมาณสูง ร้อยละ 10-35 (Nissen , 1986)

ขนเป็ดและขนไก่ไม่สามารถย่อยสลายด้วยน้ำย่อย ดังนั้นในการนำไปใช้จะต้องทำการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ด้วยการต้มภายใต้ความดันที่อุณหภูมิสูง การย่อยจะทำได้ถึงร้อยละ 75-80 ขนไก่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายมาก (Essential Amino Acid) และมีโปรตีนร้อยละ 91-94 (Gram , 1944)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คีราติน (Keratin) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผิวหนัง ขน และโครง-สร้างภายนอกต่าง ๆ ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลเฟอร์ (Sulfer) อยู่มาก และกรดอะมิโนส่วนมากอยู่ในสภาวะเป็นด่าง (Block , 1939)

2. พันธะเปปไทด์ของโปรตีน

พันธะเปปไทด์เป็นพันธะที่สำคัญ ซึ่งประกอบกันเป็นเส้นสายของโปรตีนในธรรม-ชาติ จะจับกันเป็นสายยาวเป็นล้าน ๆ โมเลกุล Hofmeister และ Ficher (1902) พบว่าโปรตีนจะจับกันในรูปของเอไมด์ (Amide) ระหว่างพันธะ -carboxyl และ -amino ซึ่งเรียกว่าพันธะเปปไทด์ เปปไทด์โดยปกติมักเป็นโครงสร้างอย่างง่าย โดยหมู่อะมิโนจะอยู่ทางซ้าย และหมู่คาร์บอกซิลจะอยู่ทางขวา (Devenyt , 1974)

$$NH_2\text{-}CHR_1\text{-}CO\text{--}NH\text{-}CHR_2\text{-}COOH$$

3. การย่อยสลายโปรตีน (Protein Hydrolysis)

เดิมเรายังไม่รู้จักโครงสร้างของโปรตีนและองค์ประกอบต่าง ๆ ของโปรตีน รวมทั้งกรดอะมิโน การวิเคราะห์โปรตีนจะทำโดยการย่อยสลาย (Hydrolysis) Proust (1819) พบกรดอะมิโนลูซีน (Leucine) ขณะทำการหมักกลูเตน (Gluten) และลิ่มนม (Curd Milk) Bracannot (1820) ใช้กรดซัลฟุริก เพื่อสลายพันธะของเจลาติน และได้กรดอะมิโนไกลซีน (Glycine) ออกมา นี่เป็นครั้งแรกที่พบว่ากรดซัลฟุริกสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้ Mulder (1839) พบว่าไม่เพียงแต่ใช้กรดซัลฟุริกเท่านั้น ยังสามารถใช้กรดไฮโดรคลอริคได้อีกด้วย Liebig (1846) ได้ทำการย่อยสลายเคซีน (Casein) ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium Hydroxide) และได้กรดอะมิโนไทโรซีนออกมาด้วย (Schmidt , 1938)

การแยกกรดอะมิโนออกจากโปรตีน ทำได้หลายวิธี คือ

3.1 การย่อยสลายด้วยกรด (Acid Hydrolysis)

3.2 การย่อยสลายด้วยด่าง (Alkaline Hydrolysis)

3.3 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzyme Hydrolysis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 การย่อยสลายด้วยกรด

โดยมากมักจะใช้กรดซัลฟุริกหรือกรดไฮโดรคลอริค มีผู้ศึกษาการใช้กรดหลายชนิด เช่น Miller และ Du Vigneaud (1929) ทดลองใช้กรดไฮโดรคลอริคผสมกับกรดฟอร์มิคสำหรับการย่อยสลายอินซูลิน (Insulin) และ Sullivan และ Hess (1921) ใช้ไททาเนียส คลอไรด์ (Titanous Chloride) ในการย่อยสลายโปรตีน

การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดบางชนิด เช่น กรดฟอสฟอริค กรดอะซิติค และกรดอะซิติคแอนไฮไดล์ (Acetic Anhydride) มีความเป็นกรดไม่แรงพอที่จะแตกพันธะโมเลกุลของโปรตีน จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ (Devenyt , 1974)

กรดซัลฟุริก เป็นกรดแก่ชนิดแรงที่มีผู้นำมาใช้ ในการย่อยสลายโปรตีน เพราะมันสามารถแตกตัวให้ประจุลบซึ่งสามารถจับกับประจุบวกพวกแคลเซียมออกไซด์ (Calcium Oxide) หรือ แบเรียมไฮดรอกไซด์ (Barium Hydroxide) ซึ่งแยกออกมาภายหลังได้ (Bailey , 1967)

กรดไฮโดรคลอริค เป็นกรดกำจัดออกยาก เพิ่งค้นพบภายหลังจากใช้กรดซัลฟุริก กรดนี้มีความสามารถและประสิทธิภาพในการแตกพันธะได้ดี จึงนิยมใช้มากกว่ากรดซัลฟุริก

3.1.1 สภาวะที่ใช้ย่อยสลายด้วยกรด

โดยปกติมักนิยมย่อยสลายโปรตีน โดยการต้มกับกรดไฮโดรคลอริค 6 นอล์มัล อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนี้พันธะเปปไทด์จะถูกย่อยสลายได้กรดอะมิโนในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์ การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดอย่างแรงไม่ทำลายกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ กรดอะมิโนพวกนี้ทน (Stable) ต่อกรดอย่างแรงและสามารถแยกกรดไฮโดรคลอริคออกได้ โดยวิธีการระเหยภายใต้ความดัน (Vacuum Evaporator) วิธีนี้ได้ถูกค้นพบและทดลองโดย Macpherson (1946)

3.1.2 ผลที่ได้หลังจากการย่อยสลายด้วยกรด

การย่อยสลายด้วยกรดจะทำให้กรดอะมิโนทริปโตเฟนซึ่งจะรวมกับอัลดีไฮด์ (Aldehyde) เช่น กลูโคส หรืออัลดีไฮด์ที่แตกสลายมาจากกรดอะมิโนตัวอื่นกลายเป็นสารสีดำที่ไม่ละลายน้ำเรียกว่า ฮูแมน (Human) ทำให้ได้กรดอะมิโนทริปโตเฟนออกมาน้อยมาก อาจกล่าวได้ว่าวิธีการย่อยสลายด้วยกรดจะทำลายสภาพกรดอะมิโนทริปโตเฟน บางครั้งอาจพบว่า กรดอะมิโนพวกซีสตีน (Cystien), ซีรีน (Serine) , ทรีโอนีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Threonine), กรดไดคาร์บอกซิลิค (Dicarboxylic Acid) ถูกทำลายด้วย

Van Slyke (1931) พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนโดยทั่วไปคือ 24 ชั่วโมง ยกเว้นโปรตีนที่ย่อยสลายยากต้องใช้เวลานานมากกว่านี้ถึง 48 ชั่วโมงเช่น กลูเตน (Gluten) และเคซีน (Casein)

นอกจากการใช้กรดซัลฟุริค และกรดไฮโดรคลอริค แล้วพบว่ายังมีการใช้กรดไฮโดรฟลูออริค (Hydrofluoric Acid), กรดไฮโดรโบรมิค (Hydrobromic Acid) กรดฟอร์มิค (Formic Acid) , กรดฟอสฟอริก (Phosphoric Acid) , กรดอะซิติก (Acetic Acid) และ กรดอะซิติกแอนไฮไดร์ (Acetic Anhydride) ได้อีกด้วย (Schmidt , 1938)

3.2 การย่อยสลายด้วยด่าง

ด่างที่นิยมใช้ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium Hydroxide) และแบเรียมไฮดรอกไซด์ (Barium Hydroxide)

3.2.1 สภาวะที่ใช้ย่อยสลายด้วยด่าง

การย่อยสลายด้วยด่างจะทำการต้มด้วยแบเรียม หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2-4 นอร์มอล ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4-8 ชั่วโมง หรือใช้การรีฟรักซ์ (Reflux) ด้วย 5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 5 นอร์มอล แบเรียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งอัตราเร็วในการย่อยสลายด้วยแบเรียมไฮดรอกไซด์ จะมากกว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ และแบเรียมอิออนที่มากเกินพอ จะถูกแทนที่ด้วยซัลเฟต (Sulfate) หรือคาร์บอเนต (Carbonate)สภาวะที่เหมาะสมที่จะย่อยได้สมบูรณ์ คือทำการย่อยสลายพันธะด้วย 4 นอร์มอล แบเรียมไฮ-ดรอกไซด์ เป็นเวลา 50-70 ชั่วโมงที่ 110 องศาเซลเซียส

3.2.2 ผลที่ได้หลังจากการย่อยสลายด้วยด่าง

การย่อยสลายด้วยด่างนั้นจะมีข้อแตกต่างจากกรด คือ กรดอะมิโนทริปโตเฟนจะถูกทำลายน้อยที่สุดในสภาวะนี้ และพบว่ากรดอะมิโนทั้งหมดที่ถูกย่อยจะมีอลานีน (Alanine) ในปริมาณสูง เพราะว่า ซีรีน (Serine) และซิสตีน (Cystine) เปลี่ยนโครงสร้างมาเป็นอลานีน (Alanine) ได้ ส่วน ลูซีน (Leucine) จะเสถียร และเกิดราซีไมเซชั่น (Racemization) ของกรดอะมิโนขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มักนิยมใช้เอมไซม์โปรทีเอส (Proteolytic Enzyme) ซึ่งจะแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโปรตีนว่าจะเลือกใช้เอนไซม์ตัวใดจึงจะเหมาะสม (Sahyun , 1948)

3.3.1 สภาวะที่ใช้ย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การจะเลือกใช้เอนไซม์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยของ เอนไซม์เองหลายประการ เช่น อุณหภูมิ ความดัน อัตราเร็วของปฏิกิริยาเอง และอื่น ๆ ขึ้นกับโครงสร้างของโปรตีนเองเป็นส่วนมาก

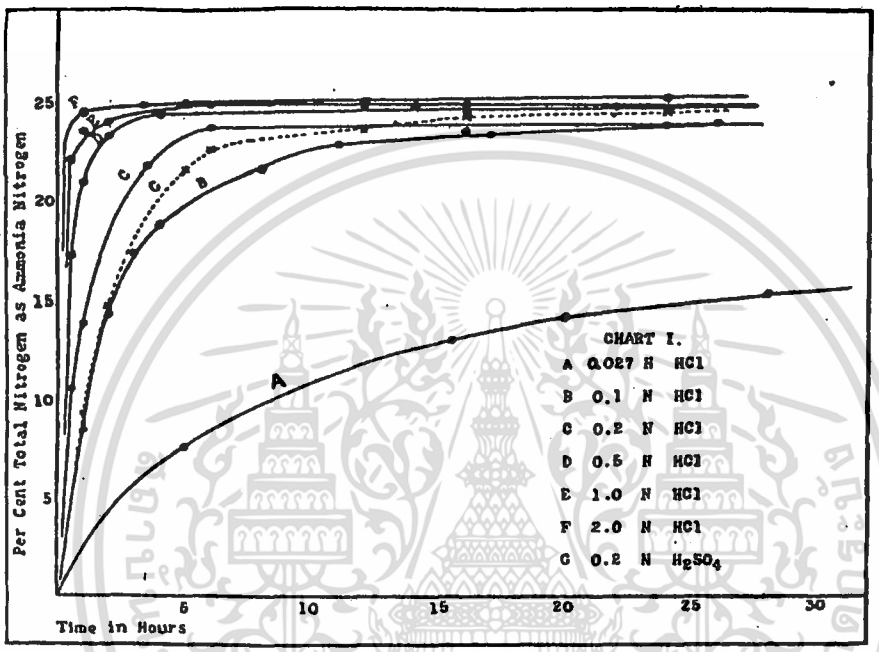
3.3.2 ผลที่ได้หลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การใช้เอนไซม์ ผลที่ได้จะให้ร้อยละของการสลายค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับการใช้กรดและด่าง เอนไซม์แต่ละตัวจะให้ผลในการย่อยสลายต่างกัน และเนื่องจากเอนไซม์มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จึงมักนิยมใช้ในงานเฉพาะอย่าง เช่น การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา

4. สภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน

การจะเลือกใช้วิธีการย่อยสลายอย่างใดอย่างหนึ่งนั่น จะต้องพิจารณาถึงวัตถุประสงค์ที่ต้องการ และสมบัติของโปรตีนเป็นสำคัญ ซึ่งเป็นไปตามหลักการที่ว่า ความร้อนหรือความเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นกับอุณหภูมิ ความดัน และความเข้มข้นของสารเริ่มต้น ซึ่งจะมีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้ในหน่วยกรัมโมเลกุลต่อลิตร เช่น การใช้เคซีน 1 กรัม ต่อ กรดซัลฟุริคเข้ม-ข้น 5 นอล์มัล 100 มิลลิลิตร แล้วทำการย่อยสลายด้วยความร้อนจะใช้เวลาสั้นกว่าการใช้เคซีน 10 กรัม ต่อ กรดซัลฟุริกปริมาณและความเข้มข้นเท่ากัน ภายใต้สภาวะเดียวกัน การพิจารณาเวลาที่ใช้ก็เป็นสิ่งสำคัญ เพราะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ทราบว่าการย่อยสลายเป็นไปได้อย่างสมบูรณ์หรือไม่ การใช้เวลามากเกินไปที่อุณหภูมิสูง กรดอะมิโนบางตัวอาจถูกทำลายหรือเปลี่ยนโครงสร้างได้ (Racimization) (Sahyun , 1948)

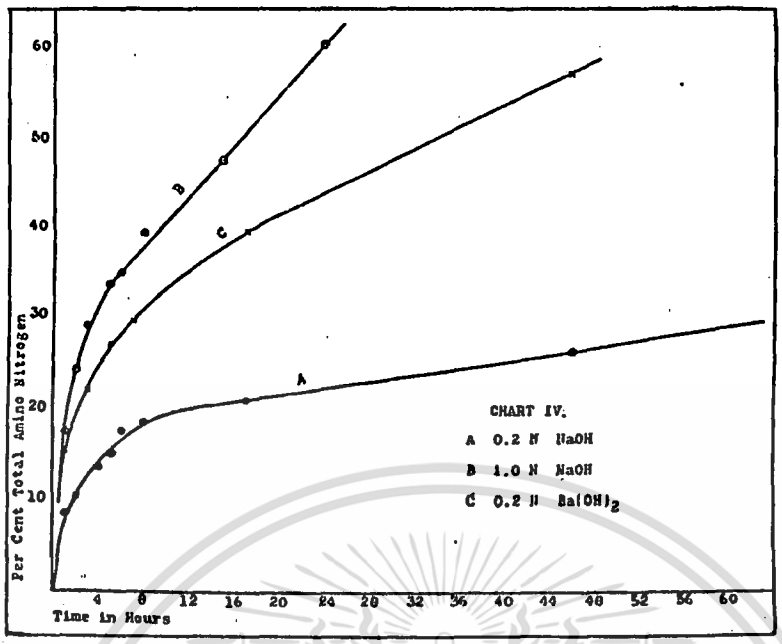
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



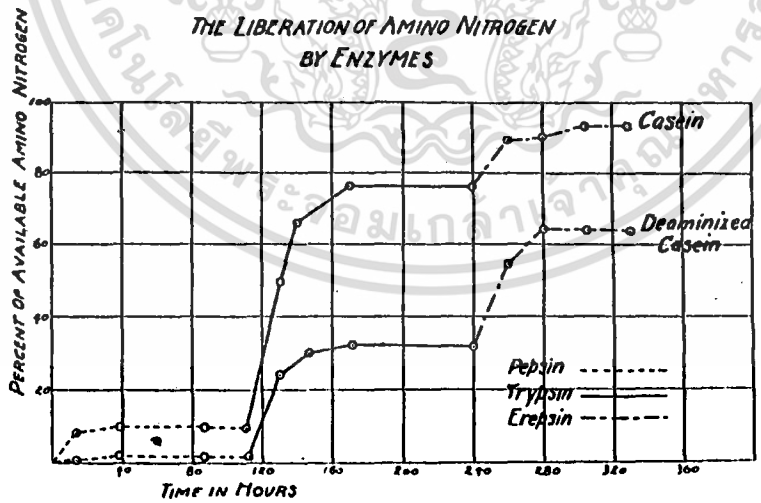
ภาพที่ 1 กราฟแสดงการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ที่มา : Vickery , 1922

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 กราฟแสดงการย่อยสลายด้วยด่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ที่มา : Vickery , 1922



ภาพที่ 3 กราฟแสดงการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ
ที่มา : Vickery , 1922

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. อัตราเร็วของการย่อยสลายโปรตีน

ได้ทดลองหาอัตราเร็วของ การย่อยสลายเคซีนด้วยกรด โดยใช้อัตราเร็วของปฏิกิริยาอันดับ 1 ส่วน Greenberg และ Burk (1926) ได้ศึกษาการย่อยสลายเจลาติน (Gelatin) Gliadin และ Fibrain (1932) ใช้ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริคและกรดซัลฟุริกที่แตกต่างกัน จากข้อมูลที่ทำการทดลองพบว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาของโปรตีนเหล่านี้ที่วัดได้จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณกรดอะมิโนที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบตามปฏิกิริยาอันดับที่สอง นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนเป็นไปตามสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ ซึ่งขึ้นกับจำนวนของไฮโดรเจนไอออน (H^+) Nasset และ Greenberg (1935) ได้ทำการศึกษาอีกครั้งในการย่อยสลายเคซีน ด้วยกรดพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นไปตาม อัตราเร็วของปฏิกิริยาอันดับสองทางเทอร์โมไดนามิกส์ (Second-order Reaction) คือ (Sahyun , 1948)

$$K = \frac{1}{t} * \frac{X}{100-X} * \frac{1}{100}$$

เมื่อ X = ร้อยละของโปรตีนที่ถูกย่อยสลายที่เวลา t

t = เวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย

K = อัตราเร็วของปฏิกิริยาอันดับสองทางเทอร์โมไดนามิกส์

6. ผลของอุณหภูมิและความดันต่อการย่อยสลายโปรตีน

การใช้อุณหภูมิสูงจะช่วยให้อัตราการย่อยสลายเกิดได้เร็วขึ้น ซึ่งจะทำภายใต้สภาวะการต้มและรีฟลักซ์ ของตัวสารกับโปรตีน จนการย่อยสลายเกิดได้สมบูรณ์ อัตราเร็วจะเพิ่มขึ้น ถ้าใช้ความร้อนภายใต้ความดันต่ำ (Schmidt , 1938)

การย่อยสลายโดยใช้กรดหรือด่างภายใต้ความดันไอของหม้อนึ่งความดันนั้น จะดีกว่าการย่อยโดยใช้ความร้อนและการรีฟลักซ์ Greenberg และ Burk (1926) ศึกษาผลของอุณหภูมิและอัตราเร็วของกรดที่ใช้ย่อยเจลาติน และสรุปสมการความสัมพันธ์ได้ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\log Ka = 0.0287\ T - 5.30$$

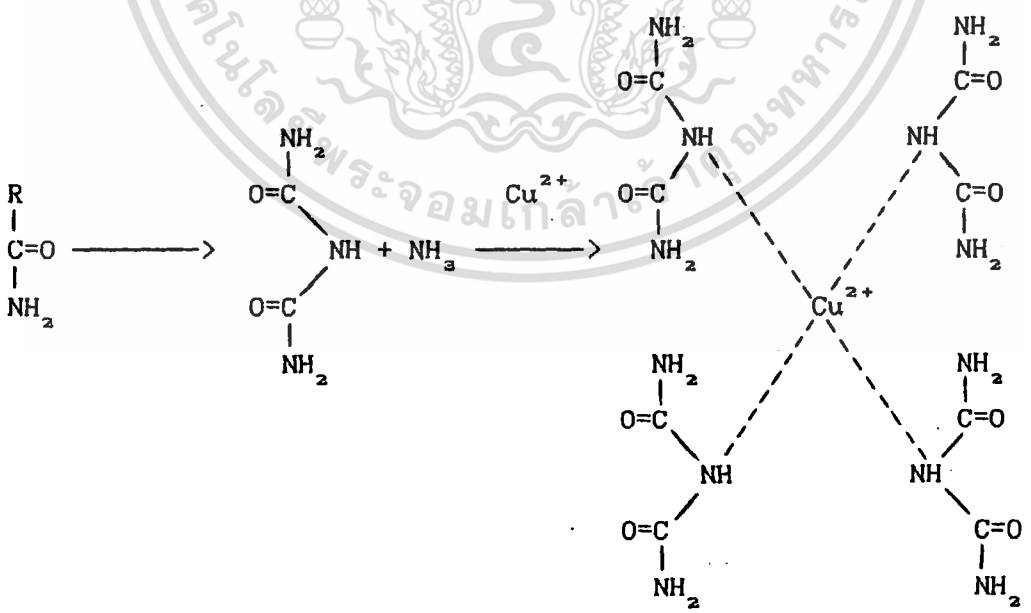
เมื่อ Ka = ค่าคงที่ความเร็ว

T = อุณหภูมิเป็น องศาเซลเซียส

7. การวิเคราะห์ผลหลังการย่อยสลาย

7.1 การวิเคราะห์ปริมาณพันธะเปปไทด์

ทำโดยใช้ปฏิกิริยาไบยูเร็ต (Biuret Reaction) (อมรินทร์ ,2529) การวิเคราะห์ปริมาณพันธะเปปไทด์ ได้จากสารละลายไบยูเร็ตทำปฏิกิริยากับพันธะเปปไทด์ที่ย่อยสลายได้ ซึ่งสารละลายไบยูเร็ตจะแตกตัวให้ Cu^{2+} ในสารละลายด่างจะให้สารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง สีที่ได้นั้นจะวัดได้ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ในการทดลองจะวัดสีได้จากปริมาณต่าง ๆ ของโปรตีนที่ใช้เป็นมาตรฐานแล้วเขียนกราฟระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณต่าง ๆ ของโปรตีนที่ใช้ เมื่อวัดสีที่ได้จากโปรตีนที่ต้องการทดสอบ จะทราบปริมาณโปรตีนได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟที่เขียนไว้ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีดังนี้ คือ (กฤษณา และ คณะ , 2521)



กรดอะมิโน ไบยูเรท สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

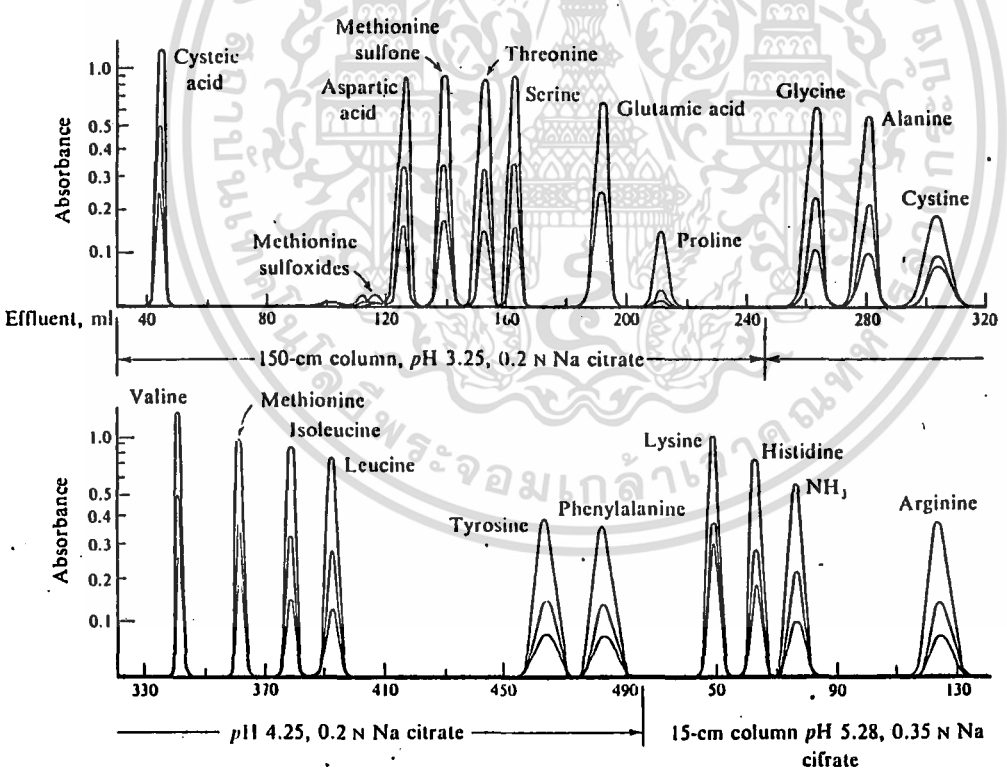
ปฏิกิริยาเกิดสีนี้ได้จาก

1) สารที่มีส่วนประกอบของโมเลกุลเป็น $-CONH_2$, $-CH_2NH_2$, $-C(NH)(NH_2)$ หรือ $-CSNNH_2$ 2 หมู่ เชื่อมเข้าด้วยกันโดยตรงหรือโดยอะตอมของ C หรือ N

2) สารประกอบเปปไทด์ที่มีการเชื่อมโยงของพันธะเปปไทด์ อย่างน้อยสองพันธะและพันธะเปปไทด์ของโปรตีน สามารถให้ปฏิกิริยานี้เช่นกัน

7.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน

โดยเครื่อง Amino Acid Analyzer



ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์จากเครื่อง Amino Acid Analyzer

ที่มา : D.H. spackman (1958)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน

หลักการทำงานของเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน คือ แยกกรดอะมิโนในของผสม โดยใช้คอลัมน์ที่มีเรซินแลกเปลี่ยนอิออน (Ion-exchange Resin) ซึ่งอาศัยสมบัติของความเป็นกรดและเบสของกรดอะมิโนในการแยกโดยการใช้ Synthetic Resin ซึ่งมีประจุที่ต้องการบรรจุลงในคอลัมน์ เรซินที่ใช้มีสองชนิด คือ Cation-exchange และ Anion

การแยกกรดอะมิโนใช้ Cation-exchange Columm บรรจุอนุภาคของ Sulfonate Polystryrene ซึ่งได้ Equilibrate ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนหมู่ กรดซัลโฟนิก (Sulfonic Acid) มี โซเดียมอิออน (Na^+) เข้าไปบรรจุอยู่เต็ม เรซินซึ่งมี โซเดียมอิออนเข้าไปบรรจุอยู่เรียกว่า โซเดียมฟอร์ม (Sodium Form) ถ้าต้องการทำให้เป็นไฮโดรเจนฟอร์ม (Hydrogen Form) ให้ล้างเรซินด้วยกรด เมื่อผ่านสารละลายของกรดอะมิโนซึ่งมี pH เท่ากับ 3 ลงบนโซเดียมฟอร์มของเรซินที่ล้างด้วยแคทอิออนของกรดอะมิโนเข้าแทนที่โซเดียมอิออนในอนุภาคของเรซินที่ pH 3 กรดอะมิโนมีประจุบวก จึงเป็น แคทอิออน (Cation) กรดอะมิโนแต่ละตัวมีดีกรีของไอออไนเซชั่น (Degree of Ionization) ไม่แตกต่างกันมากนักที่ pH 3 กรดอะมิโนชนิดที่มีโครงสร้างอย่างง่ายชนิดเบส ซึ่งได้แก่ ไลซีน อาร์จินีน และฮีสทีดีน จับติดแน่นกับเรซินด้วยแรงอิเล็กโตรสแตติค (Electrostatic Force) แต่กรดอะมิโนชนิดแอซิค เช่น กรดกลูตามิค และกรดแอสพาติค จับกับเรซินน้อยมาก เมื่อ pH ค่อย ๆ เพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ใน Eluting Aqueaus Medium เพิ่มขึ้น กรดอะมิโนเคลื่อนที่ลงในคอลัมน์ด้วยอัตราที่ต่างกัน กรดอะมิโนที่แยกออกมาจากคอลัมน์ส่งไปทำปฏิกิริยากับนินไฮดริน (Ninhydrin) ซึ่งเมื่อทำให้ร้อนขึ้นจะเกิดสีม่วงน้ำเงิน จึงปล่อยให้สารที่มีสีนี้ผ่านเข้าเครื่องวัดสี (Colorimeter) ผลที่อ่านได้จากแผ่นแสดงผล กรดอะมิโนที่เป็นแอนอิออน (Anion)เช่น กรดกลูตามิก จะออกมาก่อน ส่วนกรดอะมิโนที่เป็นแคทอิออน เช่น ไลซีน ออกมาทีหลัง ซึ่งผลจะพิมพ์ออกมาเป็นรูปโค้งต่าง ๆ แล้วนำมาหาปริมาณ และชนิดของกรดอะมิโนแต่ละตัวได้จากพื้นที่ภายใต้โค้ง การทำงานของเครื่องนี้เป็นระบบอัตโนมัติบางชนิดมีคอมพิวเตอร์อยู่ด้วย ซึ่งสามารถวัดคำนวณความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละตัวออกมาเป็นตัวเลขได้ทันที พื้นที่ของแต่ละส่วนโค้ง (Peak) เป็นสัดส่วนกับปริมาณของกรดอะมิโน

เมื่อทำการย่อยสลาย (Hydrolyze) โปรตีนจะได้กรดอะมิโน ซึ่งมีประมาณ 20 ชนิด กรดอะมิโนเหล่านี้มีหมู่อัลฟ่าคาร์บอคซิล (α -carboxyl) และหมู่อัลฟ่าอะมิโน (α - amino) นอกจากนี้มีหมู่ R ซึ่งจับกับอัลฟ่าคาร์บอนอะตอม (α -carbon Atom) หมู่ R ของกรดแต่ละตัวมีสมบัติแตกต่างกันไปจึงจัดแบ่งกรดอะมิโนออกตามลักษณะของหมู่ R กรดอะมิโนที่มีหมู่ R เป็น นอนโพลา (Non Polar) หรือ ไฮโดรโฟบิค (Hydrophobic) ได้แก่ อะลานีน (Alanine) , ลูซีน (Leucine) , ไอโซลูซีน (Isoleucine) ,เวลีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Valine) , โพรลีน (Proline) , ฟีนิลอาลานีน (Phenylalanine) , ทริปโตเฟน (Tryptophane) , และเมธไธโอนีน (Methionine) พวกที่หมู่ R มีประจุบวก หรือเป็นเบส ได้แก่ อาร์จินีน (Arginine) , ไลซีน (Lysine) และฮีททิดีน (Histidine) พวกที่หมู่ R มีประจุลบ หรือเป็นอะซิติค (Acetic) ได้แก่ กรดแอสพาติค (Aspatic Acid) กรดกลูตามิค (Glutamic Acid) นอกจากนี้ในโปรตีนบางชนิดยังมีกรดอะมิโนอื่นอีก เช่น ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) , ไฮดรอกซีไลซีน (Hydroxylysine)

กรดอะมิโนชนิด โมโนอะมิโน (Mono Amino) , โมโนคาร์บอกซิลิค (Mono Carboxylic) จัดเป็นกรดไดเบสิค (Dibasic) ที่ pH ต่ำมีสูตร $^{+}H_3NCHRCOOH$ เมื่อ pH สูงกว่า 6 โปรตอนหลุดออกจากหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl Group) กรดอะมิโนจะมีลักษณะเป็น ไดโพลา (Dipolar) หรือ สวิทเทอร์เรียน (Zwitterion) และมีสูตร $H_3^{+}NCHRCOO^{-}$ ซึ่ง มีประจุไฟฟ้ารวมเป็น 0 ถ้า pH สูงขึ้นไปอีก โปรตอนตัวที่สองจะหลุดออกกลายเป็น $NH_2CHRCOO^{-}$ เมื่อไอออไนซ์ (Iornize) ครั้งแรกค่า pK ของหมู่อัลฟาคาร์บอกซิล (α -carboxyl Group) ประมาณ 2.0-2.5 ในการไอออไนซ์ ครั้งที่สองค่า pK ของหมู่อัลฟาอะมิโน (α -amino Group) ประมาณ 9-10 ถ้ากรดอะมิโนมีหมู่ R ซึ่งแตกตัวเป็นไอออนได้ จะมีไอออนเพิ่มขึ้นแล้วแต่ค่า pK ของหมู่ R อัลฟาคาร์บอนอะตอมของกรดอะมิโนเป็นรูปอะซิมเมตริกคาร์บอน (Asymetric Carbon) ยกเว้นไกลซิน ถ้ามีอะซิม-เมตริกคาร์บอน (Asymetric Carbon Atom) อะตอม 1 ตัว จะมี สเตอริโอไอโซเมอร์ (Sterioisomer) 2 ตัว คือเป็น D กับ L สเตอริโอไอโซเมอร์ (D&L Sterioisomer) กรดอะมิโนที่พบในโปรตีนเป็นชนิด L-ไอโซเมอร์ (L-Isomer) เท่านั้น

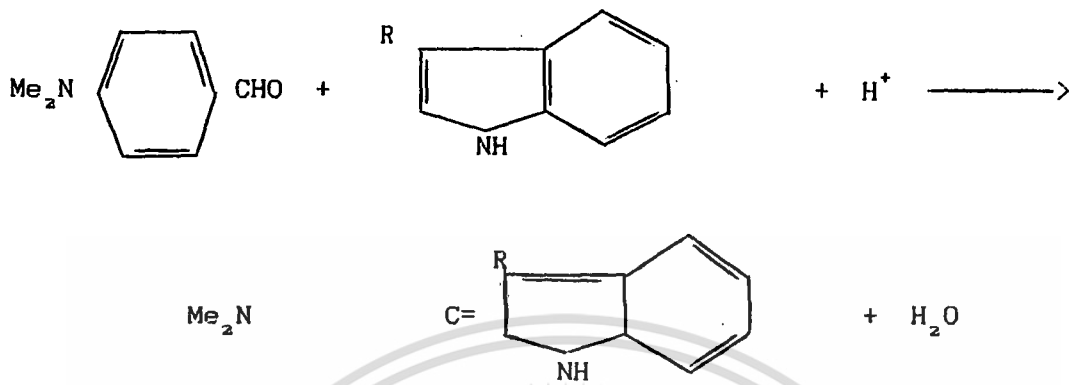
กรดอัลฟาอะมิโน ทำปฏิกิริยาให้สีกับนินไฮดริน (Ninhydrin) หมู่อัลฟาอะมิโนสามารถถูกอะซิเลต (Acylate) ได้เช่นทำกับเบนซิลคลอโรคาร์บอนเนต (Benzylchloro carbonate) ให้อนุพันธ์เบนซิโลซีคาร์บอกซิล (Benzyloxy carboxyl Derivative) ของกรดอะมิโน หมู่อัลฟาอะมิโนทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ (Aldehyde) ให้ Schiff's base และทำปฏิกิริยากับไซยาเนต (Cyanate) ให้หมู่คาร์บอกซิลและหมู่ R ของกรดอะมิโน ทำปฏิกิริยาเฉพาะตามสมบัติของมัน หมู่ไธโอ (Thiol) ของซิสเตอีน (Cystein) เมื่อถูกออกซิไดซ์ (Oxidize) ให้ซีสตีน (Cystine) ซีสตีนเมื่อถูกรีดิวซ์ (Reduce) ให้ซิสเตอีน ปฏิกิริยาเหล่านี้ มีประโยชน์ในการตรวจหาและวิเคราะห์กรดอะมิโน

7.3 การวิเคราะห์หากรดอะมิโนทริปโตเฟน

ทำโดยใช้ปฏิกิริยาเออร์ริค (Ehrlich Reaction) โดยใช้สารไดเมททิล อะมิโน-เบนซาดีไฮน์ (Dimethyl Amino-benzaldehyde) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนทริปโตเฟน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารอินโดล (Indole Derivative) ภายใต้สภาวะ

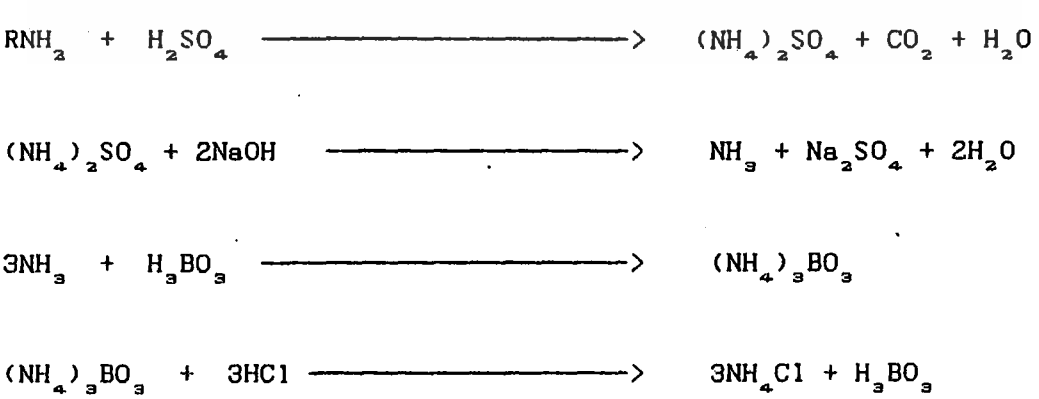
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรด จะให้สารสีม่วงแดง (Red-Violet Color) ดังปฏิกิริยา ต่อไปนี้ (Kenneth , 1965)



8. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนไนโตรเจนโดยวิธีเจร์ดาล (Kjeldahl) เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป หลักการของวิธีนี้ คือ ไนโตรเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียมอิออน (NH^+_4) โดยการออกซิไดซ์ในสารผสมเพื่อย่อยสลายสารผสมดังกล่าวประกอบด้วย กรดกำมะถันเข้มข้น โปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเกลือซึ่งทำหน้าที่เพิ่มจุดเดือดของสารผสม เมื่อเติมด่างลงไปแอมโมเนียมอิออน (NH^+_4) จะเปลี่ยนเป็นกาซแอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งแยกออกโดยการกลั่นระเหยให้ไอกาซแอมโมเนีย (NH_3) ลงในกรดบอริค (Boric Acid) แล้วไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนค่าไนโตรเจนที่ได้เป็นค่าโปรตีนรวม ทำได้โดยคูณด้วยแฟคเตอร์ 6.25 ซึ่งได้จากการประมาณค่าว่าโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยไนโตรเจนร้อยละ 16 โดยน้ำหนัก ตามวิธีวิเคราะห์ของ AOAC (1975) (กฤษณา และ คณะ , 2521)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96994

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 เลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และขนไก่

1.2 อะซิโตน (Acetone)

1.3 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

1.4 โปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)

1.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

1.6 กรดซัลฟุริก (H_2SO_4)

1.7 กรดบอริค (Boric Acid)

1.8 เมทธิลเรดบรอมคลีซอลกรีน (Methyl Red Bromcresol Green)

1.9 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.10 กรดฟอร์มิค (Formic Acid)

1.11 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

1.12 โซเดียมไธโรซัลเฟต ($Na_2S_2O_5$)

1.13 แบเรียมไฮดรอกไซด์ ($Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$)

1.14 ออกธิลแอลกอฮอร์ (Octylalcohol)

1.15 โปรตีนมาตรฐานโบวินอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin)

1.16 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต ($NaKC_4H_4O_6$)

1.17 ทริปโตเฟนบริสุทธิ์ (L-Tryptophane)

1.18 ไดเมทธิลอะมิโนเบนซาดีไฮด์ (Dimethyl Aminobenzaldehyde)

1.19 เอธานอล (Ethanol)

2. อุปกรณ์

2.1 บีกเกอร์ (Beaker)

2.2 ภาชนะอลูมิเนียม (Aluminium can)

2.3 ตู้อบ (Oven)

2.4 เครื่องปั่น (Blender)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ปิเปต (Pipette)

2.6 อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิได้ (Water bath)

2.7 ขวดแก้วก้นกลม (Round Bottom Flask)

2.8 คอนเดนเซอร์ (Condenser)

2.9 Buchner Funnel

2.10 Buchi evaporator

2.11 หลอดทดลอง (Test Tube)

2.12 เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge)

2.13 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

2.14 กระดาษกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. การเตรียมวัตถุดิบ

1.1 เลือดหมูและเลือดไก่

นำตัวอย่างเลือดสดมาปั่นด้วยเครื่องปั่น ดังภาพภาคผนวกที่ 7 เพื่อให้เม็ดเลือดเกิดการกระจายตัวจึงนำเลือดมาตกตะกอน โดยเติมในอะซิโตน ในอัตราส่วน เลือด : อะซิโตน 1 : 2 ดังภาพภาคผนวกที่ 8 แล้วนำตะกอนเลือดที่ได้ไปอบแห้งเพื่อไล่อะซิโตน ที่ อุณหภูมิ 105 + 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง นำเลือดที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด เก็บใส่ขวดแก้วปิดกันความชื้น

1.2 เลือดปลา

นำตัวอย่างเลือดปลาจากโรงงาน อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 + 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง นำเลือดแห้งมาบดให้ละเอียด เก็บไว้ในที่ไม่มีความชื้น

1.3 ขนไก่

นำตัวอย่างขนไก่จากโรงงานมาล้างให้สะอาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง นำมาตัดให้มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการย่อยสลาย

2. เปรียบเทียบองค์ประกอบต่าง ๆ ในเลือดสัตว์ และขนสัตว์

2.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมด

โดยวิธี AOAC (1975) รายละเอียดดูได้ที่ภาคผนวก ก.1

2.2 ความชื้น

โดยวิธี AOAC (1975) รายละเอียดดูได้ที่ภาคผนวก ก.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13692

2.3 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

นำเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และขนไก่ ที่บดละเอียดแล้ว หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl รายละเอียดดูได้ที่ภาคผนวก ก.3

2.4 ปริมาณโปรตีน

ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก.4

2.5 ปริมาณของแข็งภายหลังการตกตะกอนเลือดด้วยอะซีโตน (Yield)

ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก.5

3. การย่อยสลายเลือดและขนสัตว์

3.1 การย่อยสลายเลือดและขนสัตว์ด้วยวิธีกรด

นำเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และขนไก่ ที่บดละเอียด มาต้ม (Reflux) ดังรูปที่ กับกรดไฮโดรครอลิค 6 นอร์มัล ที่เวลา 15 , 20 , 24 และ 30 ชั่วโมง ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยสลาย ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธีไบยูเร็ต , เครื่องวิเคราะห์ปริมาณอะมิโน (Amino Acid Analyzer) และ ปฏิกริยาเออร์ริค รายละเอียดดูในภาคผนวก ก.6

3.2 การย่อยสลายเลือดและขนสัตว์ด้วยวิธีด่าง

นำเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และขนไก่ ที่บดละเอียดนำไปต้มกับด่างที่เวลา 15 , 20 , 24 , และ 30 ชั่วโมง ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยสลายไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธีไบยูเร็ต , เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน , ปฏิกริยาเออร์ลิค รายละเอียดดูในภาคผนวก ก.7

4. เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนและพันธะเปปไทด์ ในเลือดและขนสัตว์ ที่สภาวะการย่อยต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

4.1 วิเคราะห์ปริมาณพันธะเปปไทด์ด้วยวิธีไบยูเร็ต

นำตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยวิธีกรด และ ด่าง ในเวลาต่าง ๆ กัน มาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณพันธะเปปไทด์ ด้วยวิธีไบยูเร็ต ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก.8

4.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน

นำตัวอย่างย่อยสลายด้วยวิธีกรด ที่เวลา 24 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค

4.3 วิเคราะห์หากรดอะมิโนทริปโตเฟนด้วยปฏิกริยาเออร์ลิค

นำตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยวิธีด่าง ที่เวลาต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์หากรดอะมิโนทริปโตเฟนด้วยปฏิกริยาเออร์ลิค ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และ ขนไก่ ก่อนการย่อยสลาย

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเลือด และ ขนไก่ก่อนการย่อยสลาย มีการวิเคราะห์ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ หาปริมาณร้อยละของความชื้น , ปริมาณของแข็ง (Total Solid) , ปริมาณเนื้อของเลือดที่ได้หลังจากการตกตะกอนเลือดด้วย Acetone (Yield) และ โปรตีน ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างก่อนการย่อยสลาย

วัตถุดิบ	องค์ประกอบที่วิเคราะห์			
	ความชื้น(%)	ปริมาณของแข็ง(%)	Yield(%)	โปรตีน(%)
เลือดหมู	77.51	22.49	21.85	85.48
เลือดปลา	63.32	32.68	33.96	74.26
เลือดไก่	85.75	14.25	16.12	76.25
ขนไก่	9.28	-	-	89.16

จากผลการทดลองวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า เลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และขนไก่ มีร้อยละของความชื้นตามลำดับดังนี้ 77.5 , 65.32 , 85.75 และ 9.28 สาเหตุที่เลือดหมู และ เลือดไก่มีความชื้นสูง เนื่องจาก ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นของเหลว มีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่มาก เมื่อนำไปอบน้ำจะระเหยออกไปทำให้มีความชื้นสูง ส่วนเลือดปลาเมื่อนำมาจากโรงงานอยู่ในสภาพเลือดแข็งที่แห้ง และ ชื้น มีปริมาณน้ำน้อยกว่าเลือดหมู และเลือดไก่ จึงให้ร้อยละของความชื้นน้อยกว่า ขนไก่มีความชื้นน้อยที่สุดเพราะอยู่ในรูปของแข็งที่แห้งเกือบสนิทดีแล้ว เมื่อนำมาอบจึงให้ร้อยละของความชื้นน้อยที่สุด และ สะดวกต่อการนำมาใช้ได้ง่ายที่สุด องค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์อีกอย่างคือ ปริมาณของแข็ง (Total Solid) หลังจากนำเลือดมาอบแห้ง พบว่า เลือดหมู เลือดไก่ และ เลือดปลา มีปริมาณของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แข็งที่เหลือดังนี้ 22.49 , 32.68 และ 14.25 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเลือดทั้งสามชนิดพบว่า เลือดปลาให้ปริมาณของแข็งมากที่สุด รองลงมาคือเลือดหมู และ เลือดไก่ ที่เป็นดังนี้เพราะเลือดปลาเมื่อนำมาจากโรงงานจะอยู่ในรูปของแห้งที่ผ่านการต้มนึ่งมาแล้ว ปริมาณของแข็งที่จับตัวกันเป็นก้อนเลือดจึงมีมากกว่า น้ำเลือดหมู และ น้ำเลือดไก่ ส่วนเลือดหมู และ เลือดไก่ พบว่าเลือดหมูให้ปริมาณของแข็งมากกว่า เพราะว่าเลือดหมูเป็นปริมาณของแข็งที่เป็นองค์ประกอบมากกว่าเลือดไก่ โดยดูได้จากความข้นเหนือด ส่วนเลือดไก่จะมีลักษณะเหลวกว่า ขนไก่เราไม่ได้ทำการวิเคราะห์เพราะปริมาณของแข็งทั้งหมดก็คือตัวขนไก่ซึ่งเป็นของแข็ง ไม่มีส่วนประกอบเหมือนเลือดชนิดอื่น ถ้าคิดเทียบก็จะได้ร้อยละของของแข็ง 100 พอดี ส่วนร้อยละของ Yield ที่ได้ เมื่อตกตะกอนโปรตีนทั้งหมดในเลือดด้วยอะซิโตนในอัตราส่วน เลือด : อะซิโตน = 1:2 (อัมรินทร์ และ คณะ , 2529) แล้วนำตะกอนที่ได้มาอบแห้ง พบว่ามีร้อยละของ Yield ดังนี้ 21.85 , 33.96 และ 16.72 แสดงให้เห็นว่าของแข็งทั้งหมดที่มีอยู่ในเลือดจะถูกตกตะกอนทั้งหมด ดังนั้นร้อยละของ Yield ที่ได้จึงมีค่าใกล้เคียงกันกับร้อยละของปริมาณของแข็งที่ได้ และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญอีกอย่าง คือ การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ด้วยวิธีเจร์ดาล (Kjeldahl Method) พบว่าเลือดหมู เลือดปลา เลือดปลา และ ขนไก่ มีร้อยละของโปรตีนตามลำดับดังนี้คือ 85.48 , 74.26 , 76.25 , 89.16 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของเลือดสัตว์แต่ละชนิดพบว่าขนไก่มีปริมาณโปรตีนสูงสุด รองลงมาคือเลือดหมู เลือดไก่ และ เลือดปลา เพราะขนไก่มีองค์ประกอบของโปรตีน ซึ่งเป็นพวกคีราติน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงลำดับกันหลายล้านโมเลกุล แต่การแต่พันธะด้วยกรดซัลฟุริคจะทำได้ง่ายกว่าโครงสร้างของเลือดที่จับกันด้วยกรดอะมิโนเป็นพัน ๆ ล้านโมเลกุล และ แตกพันธะได้ยากกว่า ดังนั้นเมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟุริค และ วัดปริมาณแอมโมเนียที่กลั่นได้แล้ว ขนไก่จึงให้ร้อยละของโปรตีนมากกว่าในเลือด ส่วนเลือดด้วยกันเองพบว่า การแตกพันธะแม้จะยากแต่พบว่าเลือดหมูให้ปริมาณโปรตีนมากกว่าเลือดปลา และ เลือดไก่ อาจจะเป็นเพราะเลือดหมูมีปริมาณพันธะเป็ปไทด์ค่อนข้างสูง เมื่อย่อยด้วยกรดการทำให้อยู่ในรูปแอมโมเนียมีมาก เมื่อวิเคราะห์ผลจึงให้ร้อยละของโปรตีนสูงกว่า เลือดปลา และ เลือดไก่ และเลือดปลาเมื่อเทียบกับเลือดไก่จะให้ร้อยละของปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนนั้นไม่ใช่ว่าถ้าเลือด หรือ ขนไก่มีพันธะเป็ปไทด์มาก จะให้ร้อยละของโปรตีนมาก ขึ้นอยู่กับโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีน อาจจะมีสารพวกอื่นที่แตกตัวให้แอมโมเนีย แล้วเราสามารถวัดออกมาเป็นปริมาณโปรตีน เช่น พวกไขมัน ฟอสโฟไลปิด ต่าง ๆ เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดจะแตกตัวให้แอมโมเนียออกมาก็ได้ เช่นกัน การย่อยสลายตัวอย่างครั้งนี้ที่สำคัญเราต้องการที่จะดูปริมาณโปรตีนของตัวอย่างว่าตัวอย่างใดมีปริมาณโปรตีนสูงสุด เพื่อที่จะได้นำมาใช้ประโยชน์ให้มากที่สุดในการย่อยสลาย ดังนั้นพบว่าขนไก่มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด จึงควรที่จะนำมาพิจารณาในการศึกษาที่จะนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.ผลของการวิเคราะห์ตัวอย่างหลังการย่อยสลาย

การย่อยสลายโปรตีนจาก เลือด และ ขนไก่โดยการใช้สภาวะกรด และ ด่างที่เวลาต่าง ๆ กัน คือ 15 , 20 , 24 และ 30 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ผลภายหลังการย่อยสลายโดยวิเคราะห์ปริมาณพันธะเป็ปไทด์วิธีไบยูเรท เทสท์ ของตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ให้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 2

จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ 570 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ของตัวอย่างทั้งหมดพบว่า เลือดไก่ เลือดปลา และ เลือดหมู ที่ใช้เวลา 15 , 20 , 24 และ 30 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นการใช้เวลาเพียง 15 ชั่วโมงก็เพียงพอต่อการย่อยสลาย เพราะจะเป็นการประหยัดสารเคมีและ ไฟฟ้าในการย่อยสลาย นอกจากนั้นพบว่าร้อยละของปริมาณเป็ปไทด์ของเลือดไก่ที่เวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีย่อยสลายด้วยกรดอยู่ระหว่าง 43-46 ส่วนวิธีย่อยสลายด้วยด่างพบว่าอยู่ระหว่าง 58-85 ส่วนเลือดปลาพบว่าร้อยละของปริมาณเป็ปไทด์ที่เวลาต่าง ๆ อยู่ระหว่าง 49-54 ส่วนวิธีย่อยสลายด้วยด่างพบว่าอยู่ระหว่าง 80-90 และร้อยละของปริมาณเป็ปไทด์ของเลือดหมูที่เวลาต่าง ๆ ที่ย่อยสลายด้วยกรดอยู่ระหว่าง 30-35 ส่วนวิธีย่อยสลายด้วยด่างพบว่าอยู่ระหว่าง 30-50 จากข้อมูลทั้งหมดพบว่า ร้อยละของปริมาณพันธะเป็ปไทด์ที่ย่อยสลายด้วยด่างที่เวลาต่าง ๆ จะให้ค่ามากกว่ากรด แสดงว่าการย่อยสลายด้วยด่างจะเหลือปริมาณพันธะเป็ปไทด์ของเลือดมากกว่ากรด นั่นคือ การย่อยสลายด้วยกรดจะสามารถแตกพันธะเป็ปไทด์ของเลือดได้ดีกว่าด่าง ดังนั้นการใช้กรดในการย่อยสลายจะให้ความสามารถในการย่อยสลายได้มากกว่าด่าง เพราะกรดเป็นกรดแก่ที่มีความแรงแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออน (H^+)มากที่สามารถแตกพันธะเป็ปไทด์ ได้มากกว่าด่างที่แตกตัวให้ไฮดรอกไซด์อิออน (OH^-) (Bailey , 1967) เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายด้วยวิธีกรด และ ด่าง โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์ นั้นไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย่อยสลายได้ว่าเลือด หรือขนไก่ ชนิดใดย่อยสลายได้มากที่สุด เพราะว่าขนไก่อยู่ในสภาพของแข็ง เราไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ จึงไม่สามารถคิดเทียบร้อยละปริมาณพันธะเป็ปไทด์ของขนไก่ได้ ดังนั้นจึงนำมาเปรียบเทียบไม่ได้ ต้องดูจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง อะมิโน แอซิด อะนาไลเซอร์อีกครั้ง แต่จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้บอกได้เพียงว่า เวลาไม่มีความแตกต่างในกันในการวิเคราะห์เท่านั้น ดังนั้นการเลือกใช้สภาวะ และ เวลาที่เหมาะสมที่สุดควรเป็นการใช้กรดที่เวลา 15 ชั่วโมง ก็เพียงพอต่อการดำเนินการย่อยสลาย แม้จะได้ปริมาณกรดอะมิโนไม่มากที่สุดแต่ก็คุ้มค่าในการดำเนินการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณพันธะเป็ปไทด์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์ ของตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยกรดและด่างเมื่อเวลาต่าง ๆ กัน

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณพันธะเป็ปไทด์ (ร้อยละ)	
		วิธีกรด	วิธีด่าง
1	น้ำเลือดไก่	100.00	100.00
2	เลือดไก่ย่อยที่ 15 ช.ม.	43.53	84.74
3	เลือดไก่ย่อยที่ 20 ช.ม.	46.82	73.20
4	เลือดไก่ย่อยที่ 24 ช.ม.	46.82	75.79
5	เลือดไก่ย่อยที่ 30 ช.ม.	46.82	58.47
6	น้ำเลือดปลา	100.00	100.00
7	เลือดปลาย่อยที่ 15 ช.ม.	51.90	85.77
8	เลือดปลาย่อยที่ 20 ช.ม.	53.40	80.21
9	เลือดปลาย่อยที่ 24 ช.ม.	52.25	85.40
10	เลือดปลาย่อยที่ 30 ช.ม.	49.00	90.00
11	น้ำเลือดหมู	100.00	100.00
12	เลือดหมูย่อยที่ 15 ช.ม.	35.81	49.10
13	เลือดหมูย่อยที่ 20 ช.ม.	33.11	30.77
14	เลือดหมูย่อยที่ 24 ช.ม.	34.63	33.07
15	เลือดหมูย่อยที่ 30 ช.ม.	30.72	32.68

* หมายเหตุ ขนไก่ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ เพราะอยู่ในรูปของแข็ง ซึ่งไม่ละลายน้ำ จึงหาปริมาณพันธะเป็ปไทด์ด้วยวิธีนี้ไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนของตัวอย่างเลือด และ ขนไก่ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องอะมิโน แอซิค อะนาไลเซอร์

จากการนำตัวอย่างเลือดไก่ เลือดปลา เลือดหมู และ ขนไก่ หลังจากย่อยสลายด้วยสภาวะกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยใช้หลักการของ Ion - Exchanger จะให้ผลออกมาเป็นกราฟโดยเป็นเส้นโค้งของปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ดังภาพที่ 5

ภาพที่ 5 ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโน ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ผลที่ได้จากเครื่องอะมิโน แอซิค อะนาไลเซอร์ ของตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 3 พบว่า เลือด และ ขนไก่ มีกรดอะมิโนชนิดที่จำเป็น และ ไม่จำเป็นต่อร่างกายในปริมาณสูง เลือดปลาให้กรดอะมิโนลูซีน (Leucine) มากที่สุดคือร้อยละ 12.03 เลือดหมูให้กรดอะมิโนซีรีน (Serine) มากที่สุดคือร้อยละ 13.69 เลือดไก่ให้กรดอะมิโนลูซีน (Leucine) มากที่สุดคือร้อยละ 12.89 และขนไก่ให้ปริมาณกรดอะมิโนกลูตามิค แอซิค (Glutamic Acid) มากที่สุดคือร้อยละ 12.04 นอกจากนี้การย่อยสลายในสภาวะกรดจะทำให้โครงสร้างของกรดอะมิโนบางตัวเปลี่ยนไปโดยทำให้กรดอะมิโนซิสตีน เปลี่ยนเป็นซิสเตอิค แอซิค และ กรดอะมิโนกลูตาเมท เปลี่ยนเป็นกลูตามิค แอซิค และ พบว่าการย่อยสลายด้วยกรด กรดอะมิโนทริปโตเฟนจะถูกทำลายด้วยกรดไฮโดรคลอริค ซึ่งผลการทดลองให้ค่าเป็น 0.00 กรดอะมิโนที่มีมากในเลือด และ ขนไก่บางชนิดจำเป็นต่อร่างกาย เช่น กรดอะมิโนลูซีน (Leucine) ซึ่งร่างกายของคน และ สัตว์จำเป็นต้องใช้ การที่จะนำมาใช้ประโยชน์จึงมีค่ามาก เพราะร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ต้องรับประทานเข้าไปจึงจะนำกรดอะมิโนนั้นมาใช้ประโยชน์แก่ร่างกายได้ จากการวิเคราะห์พบว่า เลือดปลา และ เลือดไก่ มีกรดอะมิโนลูซีนสูงจึงน่าจะนำมาใช้ประโยชน์ โดยทำเป็นอาหารสัตว์ จะได้ประโยชน์สูงกว่าเลือดหมู และ ขนไก่ แม้ว่าเลือดหมู และขนไก่จะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นน้อย ก็ไม่ใช่ว่าจะใช้ประโยชน์ไม่ได้ ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และ วิธีการที่จะนำมาใช้ประโยชน์ ว่าต้องการกรดอะมิโนชนิดใดมากกว่ากันเพียงใด เมื่อคิดเทียบปริมาณโปรตีนที่ใช้เริ่มต้น และปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องอะมิโน แอซิค อะนาไลเซอร์ ก็สามารถคิดเทียบเป็นปริมาณร้อยละของโปรตีนที่ย่อยสลายได้ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4 พบว่าเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และ ขนไก่ มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้ตามลำดับดังนี้คือ 66.93 , 50.50 , 52.03 และ 77.48 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่า ขนไก่มีความสามารถในการย่อยสลายได้มากที่สุด รองลงมาคือ เลือดหมู เลือดไก่ และ เลือดปลา ตามลำดับ ขนไก่จึงน่าที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ มากกว่าเลือดชนิดอื่น เพราะโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนในขนไก่ย่อยสลายได้ง่ายกว่าในเลือด

ส่วนตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยด่างไม่ได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะมิโน แอซิค อะนาไลเซอร์ เนื่องจากงบประมาณมีจำกัด ดังนั้นการเปรียบเทียบกรดอะมิโนหลังจากการย่อยสลายด้วยวิธีกรด และ ด่างจึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนของเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และขนไก่ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมงด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กรดอะมิโน	เลือดปลา (ร้อยละ)	เลือดหมู (ร้อยละ)	เลือดไก่ (ร้อยละ)	ขนไก่ (ร้อยละ)
Aspartic Acid	8.62	5.34	9.42	9.04
Theronine	6.03	5.31	3.79	6.65
Serine	5.22	13.69	5.03	4.95
Glutamic Acid	9.82	8.57	7.64	12.04
Proline	5.71	13.63	4.87	5.70
Glycine	7.03	12.17	7.69	9.05
Alanine	11.50	5.86	11.48	10.34
Valine	6.73	8.29	9.02	5.49
Methionine	0.44	0.15	0.26	1.40
Cysteic Acid	2.23	0.84	1.42	1.40
Isoleucine	0.00	4.91	0.88	4.93
Lucine	12.03	8.48	12.89	10.18
Tyrosine	3.79	1.20	0.00	0.00
Phenylalanine	4.65	3.65	4.94	2.51
Lysine	8.31	1.36	8.17	8.40
Histidine	3.69	0.40	5.37	3.22
Arginine	4.19	5.09	7.15	4.69
Tryptophane	0.00	0.00	0.00	0.00
TOTAL	100.00	100.00	100.00	100.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

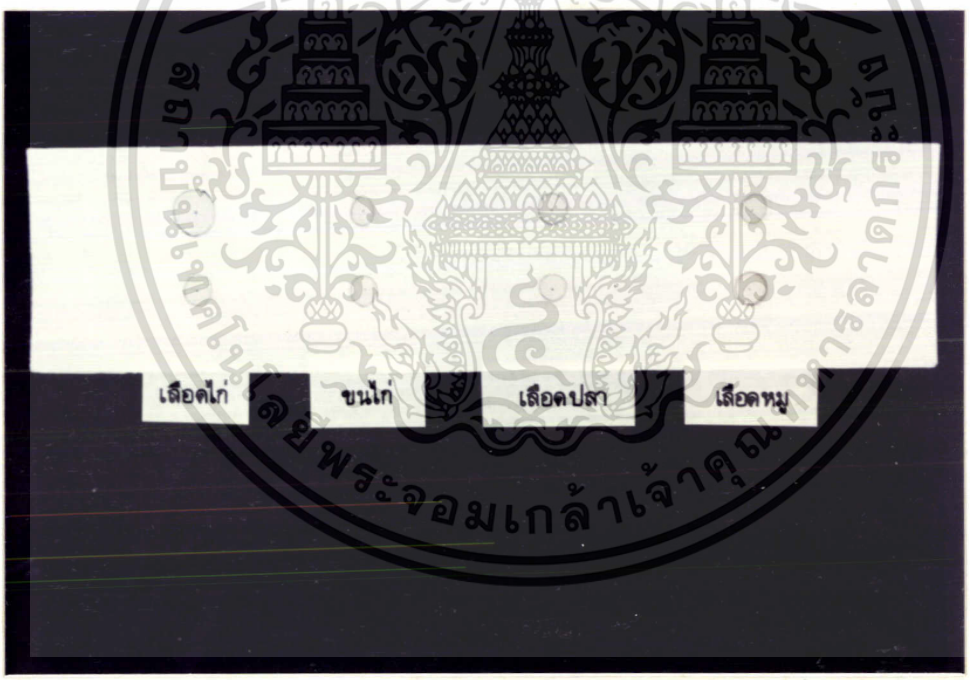
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่ย่อยสลายได้เมื่อย่อยสลาย ในสภาวะกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer

	ชนิดของเลือดและขนสัตว์			
	เลือดหมู	เลือดไก่	เลือดปลา	ขนไก่
ปริมาณกรดอะมิโนที่วัดได้ทั้งหมด	34.00	26.80	26.31	40.60
ปริมาณโปรตีนที่ใช้เริ่มต้น (mg)	50.80	51.50	52.10	52.40
ร้อยละของโปรตีนที่ย่อยสลายได้	66.93	52.03	50.50	77.48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนทริปโตเฟนของตัวอย่างเลือด และ ขนไก่ ที่ย่อยสลายด้วยด่างที่เวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี Ehrlich Reaction

การย่อยสลายเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และ ขนไก่ โดยวิธีต้มกับด่างที่เวลาต่าง ๆ กัน นอกจากจะทดสอบปริมาณพันธะเปปไทด์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์ แล้ว เรายังสามารถทำการวิเคราะห์หากรดอะมิโนทริปโตเฟนที่มีอยู่ในตัวอย่างหลังการย่อยสลาย โดยทำปฏิกริยากับสารไดเมททิล อะมิโน เบนซาดิไฮด์ (Dimethyl Amino Benzaldehyde) ได้สารสีม่วงแดงเกิดขึ้น ดังภาพที่ 6 การทดสอบนี้ เป็นการทดสอบดูความแตกต่างของผลการย่อยสลายด้วยวิธีกรด และ ด่าง โดยวิธีกรดจะทำลายกรดอะมิโนทริปโตเฟน ขณะที่วิธีด่างจะไม่ทำลายกรดอะมิโนทริปโตเฟน



ภาพที่ 6 การ Spot กรดอะมิโนทริปโตเฟนที่มีในตัวอย่างหลังการย่อยสลายด้วยด่าง โดยทำปฏิกริยากับสาร Dimethyl Amino Benzaldehyde ได้สารสีม่วงแดงเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

1. เลือดจากสัตว์ และ ขนไก่เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ เลือดหมูมีโปรตีนร้อยละ 85.48 เลือดไก่มีโปรตีนร้อยละ 76.25 เลือดปลามีโปรตีนร้อยละ 74.26 และ ขนไก่มีโปรตีนร้อยละ 89.19 ซึ่งจะเห็นว่าขนไก่มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด เหมาะที่จะนำมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีน เพื่อให้ได้กรดอะมิโน ซึ่งจะนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปในอุตสาหกรรมอื่น

2. สภาวะที่ใช้ย่อยสลายโปรตีนโดยใช้เวลาต่างกันคือ 15,20,24 และ 30 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าเวลาที่ใช้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ ของการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์ ที่เวลาต่าง ๆ ดังนั้น ควรใช้เวลาเพียง 15 ชั่วโมง ก็เพียงพอ

3. สภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนโดยใช้กรด และ ด่าง จากผลการทดลองด้วยวิธีกรดพบว่า กรดจะทำลายกรดอะมิโนทริปโตเฟน ซึ่งดูผลได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องอะมิโน แอซิด อะนาไลเซอร์ นอกจากนั้นจะเปลี่ยนซีสตีน เป็น ซีสเตอิค แอซิด และ กลูตาเมท เป็น กลูตามิค แอซิด

4. จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเครื่องอะมิโน แอซิด อะนาไลเซอร์ ของตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง พบว่าขนไก่ เลือดหมู เลือดปลา และ เลือดไก่ มีปริมาณกรดอะมิโนเรียงตามลำดับจากมากไปน้อย คือ ซีรีนร้อยละ 13.69 ลูซีนร้อยละ 12.89 กลูตามิค แอซิดร้อยละ 12.04 และ ลูซีนร้อยละ 12.03 และ สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ร้อยละ ตามลำดับดังนี้ 77.48 , 66.93 , 50.50 , 52.03

5. จากตัวอย่างทั้งหมดพบว่าที่สภาวะทดลองดังกล่าว ขนไก่สามารถย่อยสลายได้มากที่สุด จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์มากกว่าเลือดชนิดอื่น สภาวะการย่อยสลายด้วยด่าง ให้ข้อแตกต่างจากการย่อยสลายด้วยกรด คือ จะรักษากรดอะมิโนทริปโตเฟนไว้ได้ ซึ่งทดสอบได้จากปฏิกิริยาเออร์ริค ให้ผลบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองครั้งนี้พบว่า เลือด และ ขนไก่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนเมื่อผ่านการย่อยสลายมาแล้วในปริมาณที่มาก จึงควรที่จะนำเลือด และ ขนไก่ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานฆ่าสัตว์ นำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่น เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นที่ร่างกายสัตว์ต้องการให้มากขึ้น โดยทำในรูปอาหารผง หรือ ผสมลงในสูตรของอาหารสัตว์

2. การทดลองโดยการย่อยสลายโปรตีนในครั้งนี้ต้องใช้สารเคมีจำนวนมาก ถ้าคิดต้นทุนในการใช้จ่ายจะไม่คุ้มกับผลิตผลที่ได้ ดังนั้นถ้าจะนำวิธีนี้มาใช้จริง ๆ ควรจะลดจำนวนเวลา และ เพิ่มปริมาณวัตถุดิบให้มากขึ้น

3. วิธีการวิเคราะห์โดยย่อยสลายโปรตีนด้วยกรด และ ด่างเหมาะที่จะใช้กับโปรตีนปริมาณน้อย จึงจะทำให้การย่อยเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ วิธีนี้มักนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางชีวเคมี ที่เกี่ยวกับเลือดมนุษย์มากกว่าที่จะใช้ในทางอุตสาหกรรม จึงควรที่จะศึกษาวิธีที่ประหยัด และ สะดวกเพื่อใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอย่างจริงจัง ซึ่งอาจจะใช้การย่อยสลายภายใต้สูญญากาศ ที่ความดันสูงก็สามารถกระทำได้เช่นกัน

4. การนำไปใช้ประโยชน์ของโปรตีนที่ย่อยสลายแล้ว ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่นำไปใช้ ถ้าต้องการกรดอะมิโนทริปโตเฟน ควรใช้วิธีย่อยสลายด้วยด่าง แต่ถ้าไม่คำนึงถึงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนควรใช้วิธีย่อยสลายด้วยกรด เนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีกว่าด่างเมื่อใช้สภาวะเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์ และ มรว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์ . 2521 . ปฏิบัติการและหลักการเบื้องต้นในวิชาชีวเคมี . โครงการตำราศิริราช . 202 น.

ดวงสมร ลิ้มเจริญสิริ และคณะ . 2531 . การศึกษาคุณค่าทางอาหารของขนไก่บ่นชนิดย่อยสลายแล้วที่ผลิตในประเทศไทย . การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 26 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพ.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ . 2530 . การแปรรูปเนื้อสัตว์ . ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 67 น.

ราชันทร์ บัวบาน . 2531 . การใช้ขนไก่บ่นชนิดย่อยสลายแล้วเป็นแหล่งโปรตีนในสุกรระยะเจริญเติบโต-ขุน . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพ.

สุชีพ สุขสุแพทย์ . 2523 . การปรับปรุงการใช้ประโยชน์ขนไก่ปนเป็นแหล่งโปรตีน สำหรับเป็ด . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพ.

A.O.A.C. 1975 . Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists . 11 Edition , Washington D.C. The Association of Official Analytical Chemists . p.1094

Bailey , J.L . 1967. Techiques in Protein Chemistry . Elsevier Publishing Company . London . p. 148

Block , R.J. 1939 . The Amino Acid Composition of Hair,Wool,Horn Other Eukeration . J.Biol.Chem (5)

Brown , J.R. 1976 . Structual Origins of Manmalian Albumin . Federation Proceedings . Vol 35 . No. 10 , August

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Devenyi , R.J. and Tidor , P.Q. 1974 . Amino Acid , Peptides and Proteins . Elsevier Scientific Publishing Company . New York . U.S.A. p.398

Eggum , O.B. 1968 . Determination of Tryptophane . Acta Agriculture Scandinavica . (18) . p.58

Gohl , B.O. 1981 . Tropical Feeds . FAO. Animal Production and Health Series . Rome . Italy . p.26

Gram , C.R. and Almine , H.J. 1944 . Beef Blood Protein in Chick Diets . Poultry Sci. p.156

Hoag , P. 1972 . The Chemistry of Proteins . A Unilever Educational Booklt . p.45

Joslyn , M.A. 1970 . Methods in Food Analysis . Acedemic Press , London . U.K.

Light , A.B. 1974 . Protein Structure and Function . Prentice-Hall. New Jersey . USA.

Mahler , H.R. and Cordes , E.H. 1966 . Biological Chemistry . Harper & Row Publish . England .

Neurath , H . 1963 . The Proteins Composition , Structure and Function . Vol. 1 . Second Edition . Acadamic Press . London . U.K.

Nissen , A.L. 1986 . Enzymic Hydrolysis of Food Proteins . Elsevier Applied Science Publismers . U.K.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pomeranz ,Y.H. and Meloan , C.E. 1978 . Food Analysis Theory & Practive revised Edition . AVI. Publishing . USA

Price , J.F. and Selweigert , B.S. 1970 . The Science of Meat and Meat Product . W.H. Freeman and Company .San Francisco . USA

Schmidt , C.R. 1938 .The Chemistry of The Amino Acids and Proteins. Springfield . Illinois . USA

Weidner , K.S. and Eggum , B.O. 1966 . Protein Hydrolysis A Description of the Method Used at The Department of Animal Physiology in Copenhagen . Acta Argriculture Scandinavica 16

Weidner , K.S. and Eggum , B.O. 1966 . Protein Hydrolysis . Acta Argriculture . Scandinevvica

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ก.1 การหาปริมาณของแข็งทั้งหมดในเลือด (Total Solid)

นำตัวอย่างเลือดสดที่ผ่านการทำให้เม็ดเลือดแตกตัวแล้ว 2 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะอลูมิเนี่ยม (Aluminuim Can) ที่แห้งสนิทและรู้น้ำหนักแน่นอน ชั่งน้ำหนักเลือดนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อน (Water Bath) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 105+1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่

วิธีคำนวณ

ปริมาณของแข็งทั้งหมดในเลือดคิดเป็นร้อยละ = 100 - 100 * W/M

W = น้ำหนักของเลือดที่หายไป เป็นกรัม
M = น้ำหนักของเลือดที่ใช้เริ่มต้น เป็นกรัม

ก.2 การหาความชื้น

ชั่งเลือดสดที่ผ่านการตีปั่นให้ส่วนผสมของเม็ดเลือดและน้ำเลือดเข้ากันดีแล้วมาประมาณ 2 กรัม ที่ทราบน้ำหนักโดยละเอียด ใส่ในภาชนะอลูมิเนียมที่แห้งสนิทและรู้น้ำหนักแน่นอน นำไปใส่ในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 105+1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ที่อุณหภูมิห้องและชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำอีกครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่ชั่งได้สองครั้งต้องไม่ต่างกันมากกว่า 1 มิลลิกรัม)

ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละ = 100 * A/B

A = น้ำหนักของเลือดสดที่หายไป เป็นกรัม
B = น้ำหนักของเลือดสดที่ใช้เริ่มต้น เป็นกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen)

ใช้วิธีการวิเคราะห์ของ AOAC (1975) โดยเปลี่ยนแปลงตัวเร่งปฏิกิริยา ใช้คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) และโปตัสเซี่ยมซัลเฟต(K_2SO_4) ในอัตราส่วน 1:15 โดยน้ำหนัก การเตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างมา 20 มิลลิกรัม ใส่กระดาษกรองห่อให้เรียบร้อยเพื่อไม่ให้ตัวอย่างติดข้างภาชนะ นำกระดาษห่อตัวอย่างใส่ลงใน Kjeldahl Flask แล้วเติมคะตะลิส (Catalyst) 1 ช้อนพร้อมลูกแก้วเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น (conc.H_2SO_4) 10 มิลลิลิตร จนได้สารละลายสีฟ้าใส ประมาณ 6-9 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นจึงนำเข้าเครื่องกลั่นขนาดเล็ก (Micro Distillation Apparatus)โดยเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร และโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 30 จำนวน 50 มิลลิลิตร ทำการกลั่นด้วยเครื่อง Buchi 321 ภายใต้สูญญากาศ เป็นเวลา 3 นาที จับกาซแอมโมเนียที่กลั่นได้ด้วยกรดบอริค ร้อยละ 4 จำนวน 50 มิลลิลิตร โดยหยดอินดิเคเตอร์คือ Methyl Red Bromocresal Green 2-3 หยด สารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีฟ้าอมเขียว จึงนำมาไตเตรทกับกรดไฮโดคลอริค (HCl) 0.1 N จนสีเปลี่ยนจากสีฟ้าอมเขียวเป็นสีชมพูอีกครั้ง บันทึกปริมาตรที่ใช้คำนวณปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด = 1.44* จำนวนมิลลิลิตรของHCl* NของHCl/น้ำหนักตัวอย่าง

ก.4 การหาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนคิดเป็นร้อยละ = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด * 6.25

ก.5 การหาปริมาณการตกตะกอนของเลือด

ชั่งน้ำหนักเลือด 10 กรัมโดยละเอียด นำมาตกตะกอนด้วยอะซีโตน ในอัตราส่วน เลือด : อะซีโตน = 1 : 2 นำตะกอนเลือดอบแห้ง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน คำนวณหาร้อยละของตะกอนของเลือด

ร้อยละของตกตะกอนของเลือด = 100 * B / A

A = น้ำหนักเลือดเริ่มต้น เป็นกรัม

B = น้ำหนักตะกอนของเลือด เป็นกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.6 การย่อยสลายเลือดและขนสัตว์ด้วยวิธีกรด (Acid Hydrolysis)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีคเกอร์ใบที่ 1 และนำบีคเกอร์ใบที่ 2 บรรจุไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 30 จำนวน 0.125 มิลลิลิตร และกรดฟอร์มิคเข้มข้น 1.125 มิลลิลิตร หรืออัตราส่วน 1:9 โดยปริมาณ นำไปทำให้ร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ในบีคเกอร์ใบที่ 1 นำไปให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15นาที พร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลา แล้วจึงเติมโซเดียมไธโดซัลเฟต ในปริมาณที่มากเกินพอ หลังจากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดเทใส่ขวดแก้วก้นกลม (Round Bottom Flask) พร้อมทั้งเติม 100 มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริค 6N ทำการรีฟลักซ์ เป็นเวลา 15,20,24 และ 30 ชั่วโมงจนครบกำหนด นำออกตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยเครื่องกรอง (Buchner Funnel) ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนแห้ง เติมน้ำกลั่นเพื่อล้างตะกอนและปรับปริมาตรให้ได้ 15 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างใส่หลอดแก้วไว้ในที่เย็นเพื่อวิเคราะห์ผลในขั้นต่อไป

ก.7 การย่อยสลายเลือดและขนสัตว์ด้วยวิธีด่าง (Alkaline Hydrolysis)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม และแบเรียมไฮดรอกไซด์ 14.25 กรัม บรรจุในขวดแก้วก้นกลม ผสมให้เข้ากัน เติม Octylalcohol 5 หยด น้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร และลูกแก้ว นำไปทำการรีฟลักซ์ เป็นเวลา 15,20,24 และ 30 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาเทใส่บีคเกอร์ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ตกตะกอนแบเรียมไฮดรอกไซด์ด้วย 3-3.5 มิลลิลิตรของกรดซัลฟูริคเข้มข้น กวนตลอดเวลา 25-30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำไปเหวี่ยงแยกตะกอนออก นำส่วนใสใส่หลอดแก้วเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

ก.8 การหาปริมาณพันธะเปปไทด์ด้วยวิธีไบยูเรท (Biuret Test)

ก.8.1 เตรียมสารละลาย Biuret Reagent

ละลาย $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.5 กรัม และ Rochell Salt (Soduim Potassium Tartrate , $NaKC_4H_4O_6$) 6 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 10 จำนวน 300 มิลลิลิตร พร้อมทั้งคนตลอดเวลา ปรับปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.8.2 วิธีการวิเคราะห์

บรรจุสารละลายโปรตีนมาตรฐานโบวินซีรั่มอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin , BSA) (100 mg/10 ml) 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบแต่ละหลอด เติมน้ำลงในแต่ละหลอด ให้มีปริมาตร เท่ากับ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไบยูเรท หลอดละ 4 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ถ้าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารที่ต้องการทดสอบสูงกว่า 0.8 ควรทำซ้ำโดยการใช้ปริมาตรสารละลายโปรตีนน้อยลง หรือ เจือจางก่อนใช้ และ ถ้าค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า 0.05 ควรใช้ปริมาตรโปรตีนมากขึ้น หรือ เตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบเข้มข้นมากกว่านี้

หลอดที่ (ทำ 2 ชุด)	1	2	3	4	5	6
ปริมาตรโปรตีน (ml)(10 mg/ml)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
ปริมาตรน้ำกลั่น (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
ปริมาตรโปรตีนมาตรฐาน (mg)	0.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0

ก.8.3 การแสดงผลการทดลอง

เขียนกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และ ปริมาณโปรตีนมาตราฐาน BSA ได้เป็นกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) แล้วจึงใช้กราฟนี้หาปริมาณโปรตีนในเลือดและซนสัตว์

ก.9 การหากรดอะมิโนทริปโตเฟนด้วยวิธีเออร์ริค เทสท์

เตรียมสารละลายไดเมททิลอะมิโนเบนซาดีไฮด์ (Dimethylamino Benzaldehyde) โดยชั่งสารมา 0.1 กรัม ละลายในเอธานอล ร้อยละ 95 แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริค 0.4 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองตัดขนาดพอเหมาะ กำหนดจุดบนกระดาษกรองให้จุดแต่ละจุดบนกระดาษกรองห่างเท่ากัน ทำการหยดตัวอย่างที่ย่อยสลายแล้วบนจุดที่กำหนด นำไปทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วจึงหยดทับด้วยสารละลายไดเมททิลอะมิโนเบนซาดิไฮด์ จากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 3-5 นาที สังเกตสีที่จุดที่ทดสอบจะเห็นสีม่วงแดงปรากฏขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

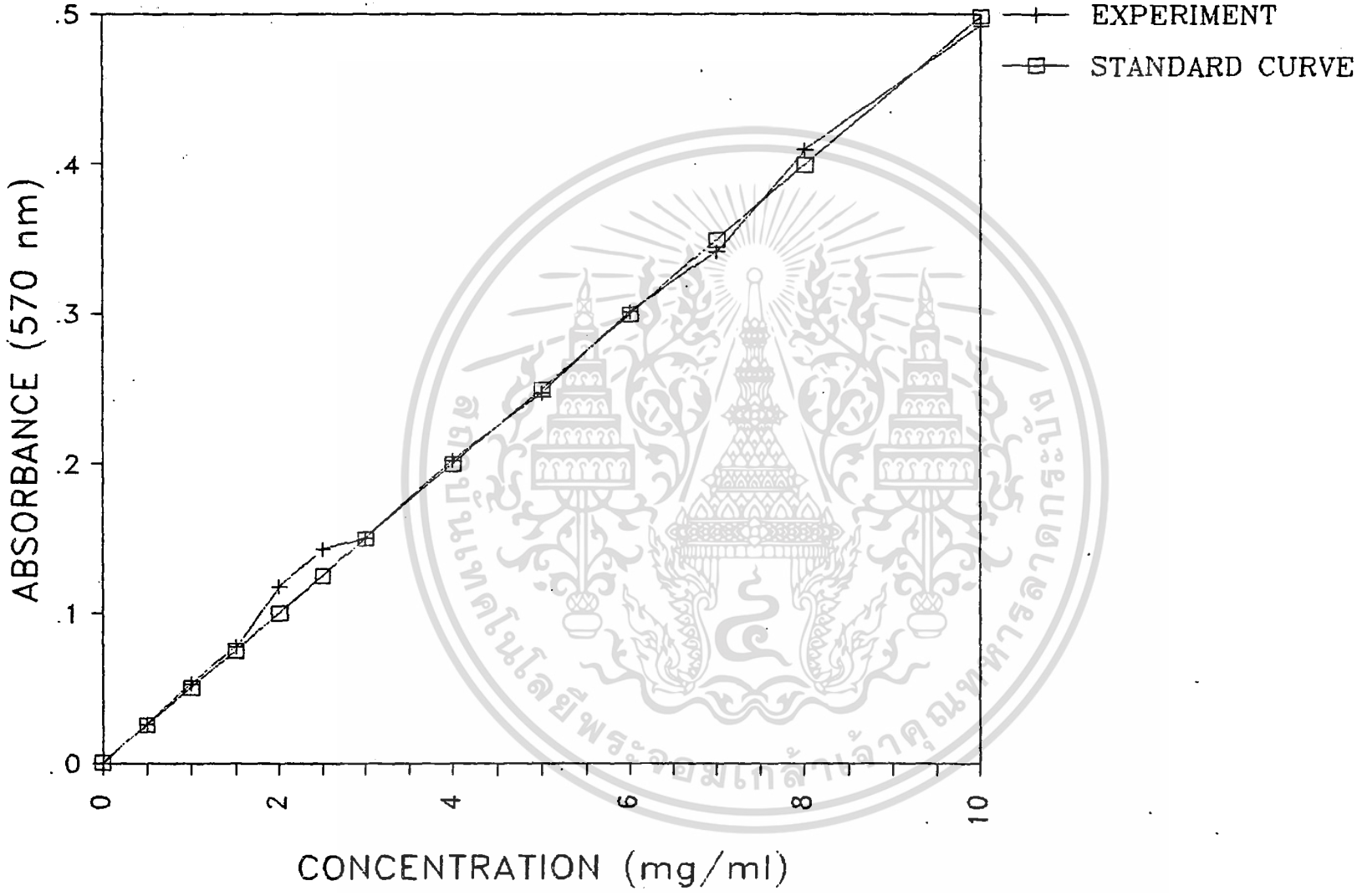
ภาคผนวก ข

<u>กราฟมาตรฐานของโปรตีนโบวินซีรั่มอัลบูมิน</u> (Bovine Serum Albumin , BSA)

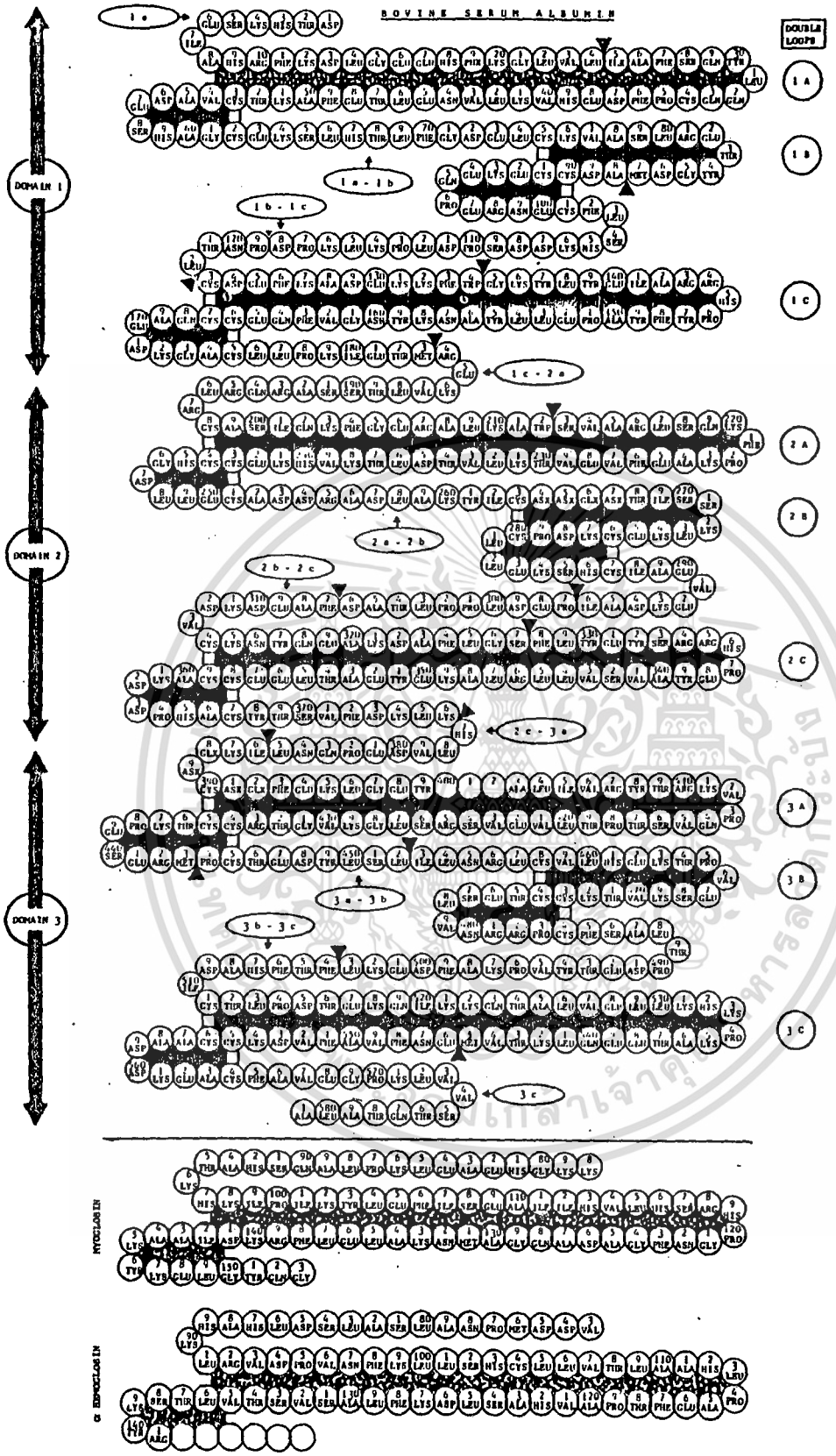
ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA

ปริมาณ BSA (mg)	ค่า Absorbance ของโปรตีนมาตรฐาน (570 nm)
0.00	0.00
0.50	0.026
1.00	0.053
1.50	0.078
2.00	0.118
2.50	0.143
3.00	0.150
4.00	0.202
5.00	0.247
6.00	0.301
7.00	0.341
8.00	0.409
10.00	0.492

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟแสดงกราฟมาตราฐานของโปรตีนมาตราฐาน Bovine Albumin



ภาพภาคผนวกที่ 2 โครงสร้างโปรตีนมาตราฐาน Bovine Albumin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณพันธะเปปไทด์ด้วยวิธี ไบยูเรท เทสท์ ของตัวอย่างเมื่อวิเคราะห์ด้วยกรด และ ด่างที่สภาวะต่าง ๆ กัน ที่ 570 นาโนเมตร

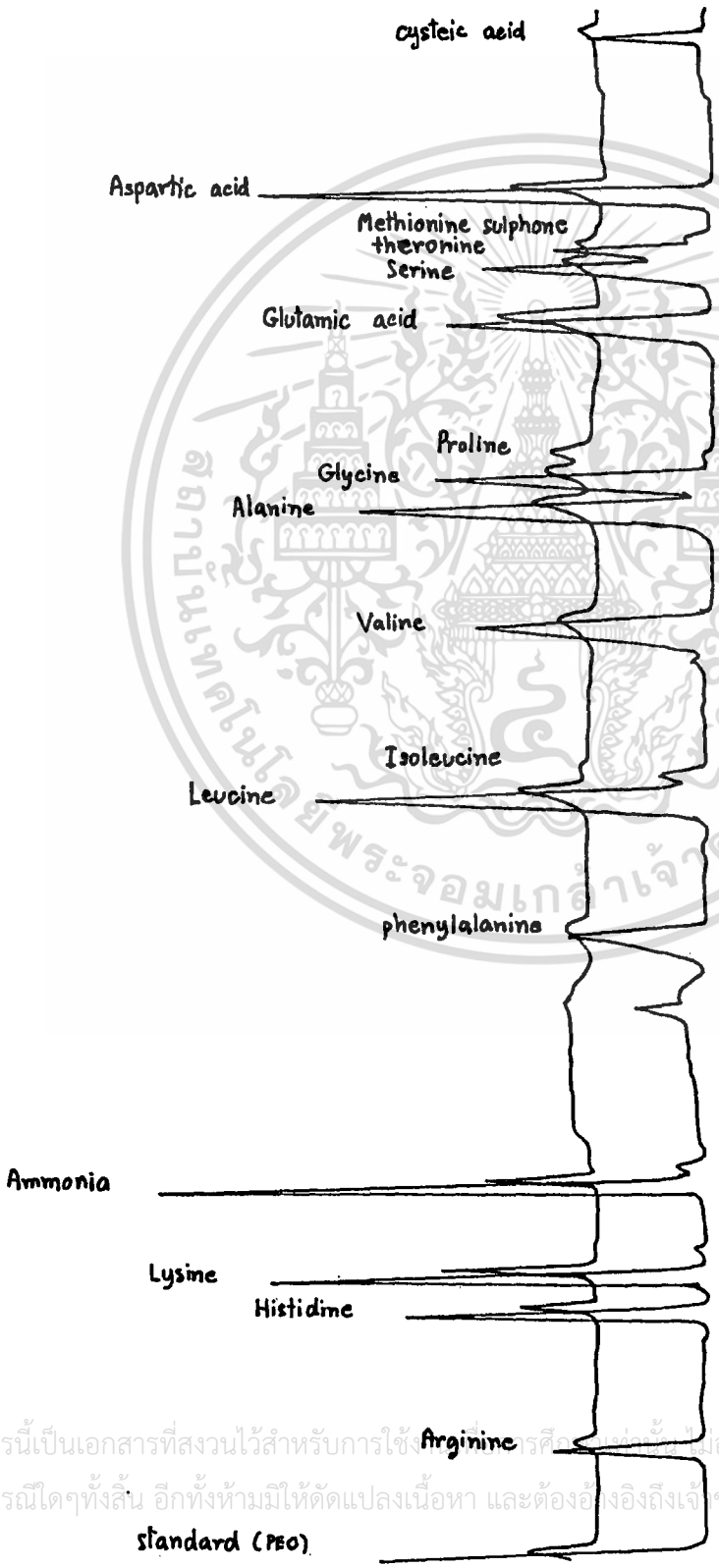
ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	ค่าAbsorbance เมื่อย่อยด้วยกรด	ค่าAbsorbance เมื่อย่อยด้วยด่าง
1	น้ำเลือดไก่	0.210	0.210
2	เลือดไก่ย่อยที่ 15 ช.ม.	0.095	0.073
3	เลือดไก่ย่อยที่ 20 ช.ม.	0.099	0.068
4	เลือดไก่ย่อยที่ 24 ช.ม.	0.098	0.071
5	เลือดไก่ย่อยที่ 30 ช.ม.	0.099	0.064
6	น้ำเลือดปลา	0.173	0.173
7	เลือดปลาย่อยที่ 15 ช.ม.	0.092	0.061
8	เลือดปลาย่อยที่ 20 ช.ม.	0.095	0.064
9	เลือดปลาย่อยที่ 24 ช.ม.	0.093	0.061
10	เลือดปลาย่อยที่ 30 ช.ม.	0.085	0.060
11	น้ำเลือดหมู	0.256	0.256
12	เลือดหมูย่อยที่ 15 ช.ม.	0.092	0.068
13	เลือดหมูย่อยที่ 20 ช.ม.	0.080	0.057
14	เลือดหมูย่อยที่ 24 ช.ม.	0.089	0.058
15	เลือดหมูย่อยที่ 30 ช.ม.	0.079	0.054

* หมายเหตุ ขนไก่ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เพราะอยู่ในรูปของแข็ง จึงไม่ได้แสดงผลการวิเคราะห์ในตารางนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

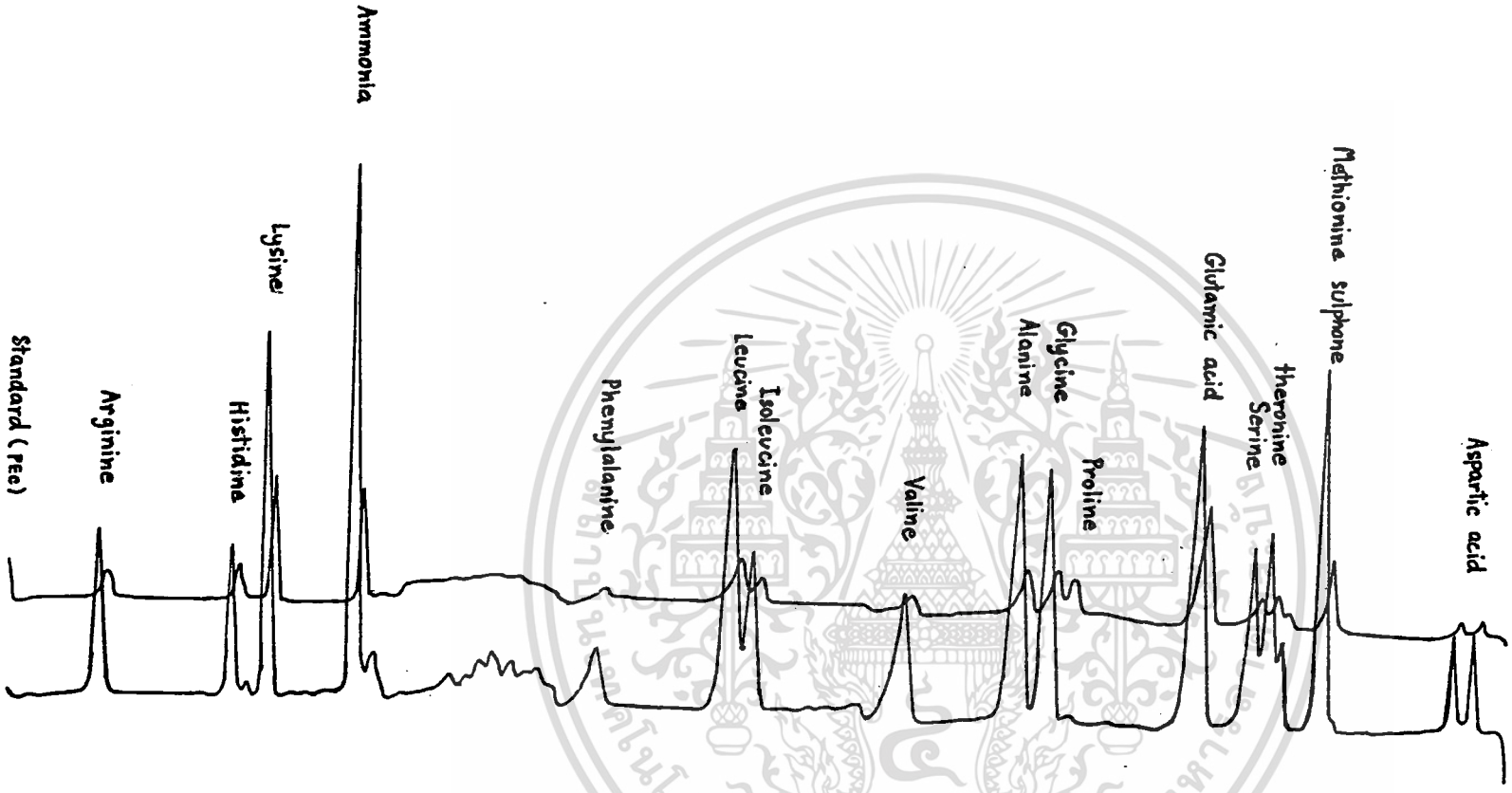
ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer ของเลือดหมู เลือดปลา เลือดไก่ และ ขนไก่ ที่สภาวะการย่อยสลายด้วยกรด ที่เวลา 24 ชั่วโมง

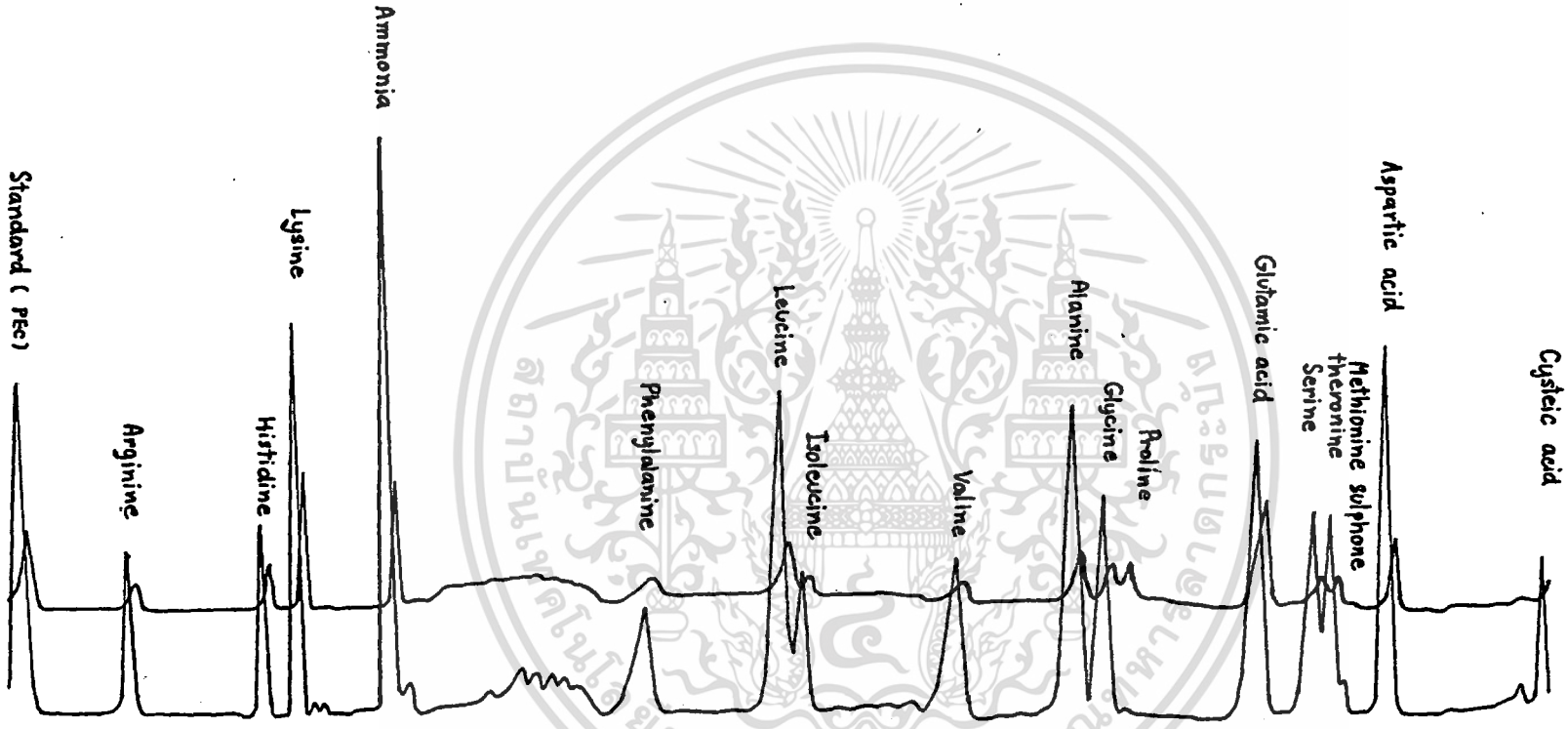


ภาพภาคผนวกที่ 3 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer ของเลือดหมูหลังการย่อยสลายด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง

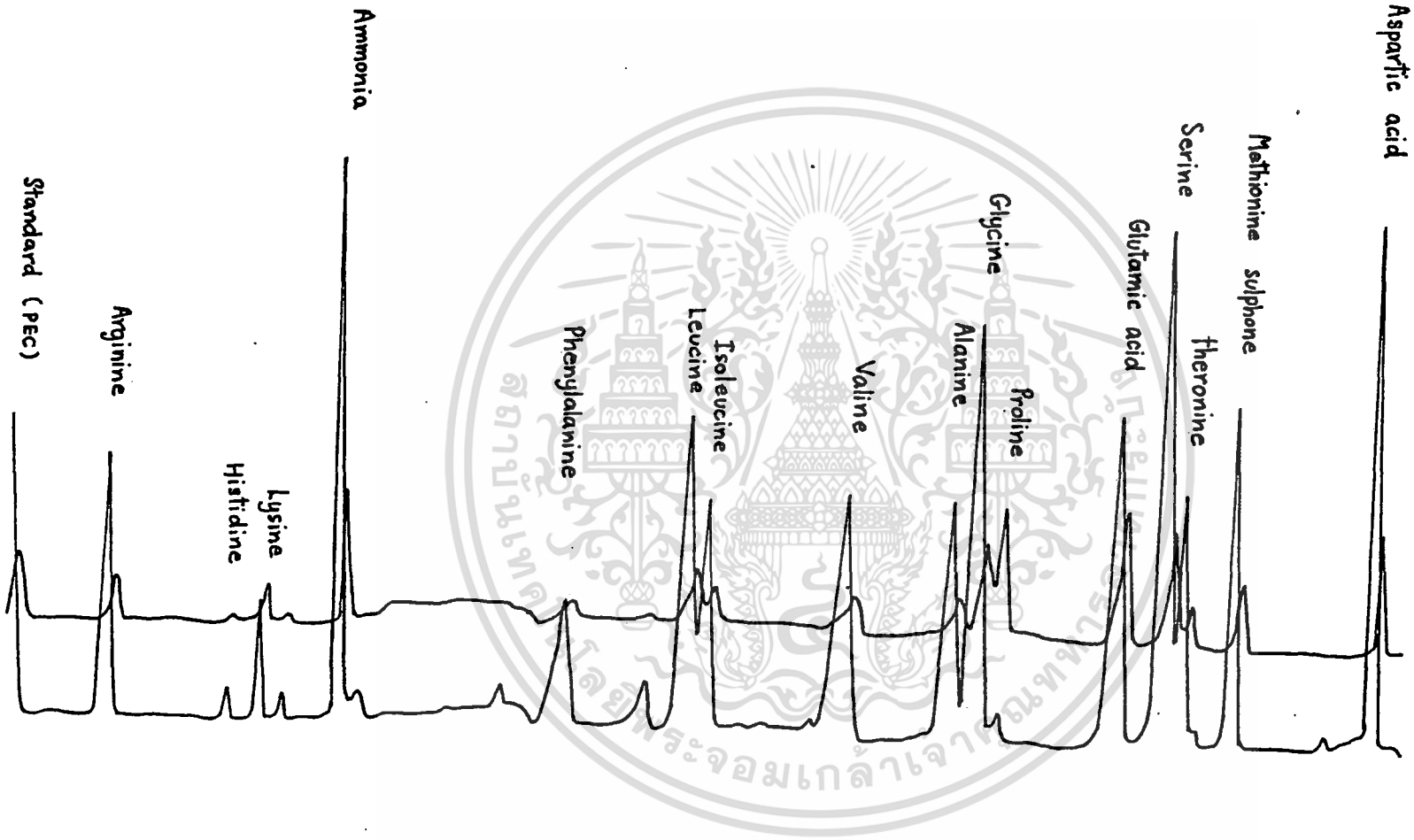
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ 4 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer
ของเลือดปลาหลังการย่อยสลายด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพภาคผนวกที่ 5 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer
ของเลือดไก่หลังการย่อยสลายด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพภาคผนวกที่ 6 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino Acid Analyzer
ของซนไก่หลังการย่อยสลายด้วยกรดที่เวลา 24 ชั่วโมง

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance)

การวิเคราะห์วาเรียนซ์สำหรับผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของตัวอย่าง ก่อน และหลังการย่อยสลาย กระทำโดยการพิจารณาข้อมูลจากการทดลองแบบ One Tail (พอใจ ,2531) การทดลองทำ 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ได้แก่ ค่าความชื้น โปรตีน และ ปริมาณพันธะเป็ปไทด์ เมื่อเวลาต่าง ๆ ซึ่งใช้ข้อมูลต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

F ของ Treatment เมื่อเทียบกับค่า F ในตารางสำเร็จรูป (พอใจ,2531) โดยเปิดค่า F ที่ df 3 และ 11 และ df 3 และ 7 ได้ดังนี้

$F_{0.05}$ (3,11) = 4.07

$F_{0.05}$ (3,7) = 4.037

การสรุปผลมีหลักเกณฑ์ดังนี้

ถ้า F ที่คำนวณได้น้อยกว่า $F_{0.05}$ สรุปได้ว่าไม่ต่างกันในทางสถิติใช้แทนด้วยอักษร NS และไม่จำเป็นต้องไปศึกษาหรือเปรียบเทียบต่อไป

แต่ถ้า F ที่คำนวณได้เท่ากับหรือมากกว่า $F_{0.05}$ แต่ไม่มากกว่า $F_{0.01}$ สรุปได้ว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Significant) ในทางสถิติแทนด้วยเครื่องหมาย *

และถ้า F ที่คำนวณได้มากกว่าหรือเท่ากับ $F_{0.01}$ สรุปได้ว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (Highly Significant) ในทางสถิติใช้แทนด้วยเครื่องหมาย **

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงการวิเคราะห์ Variance โดยวิธี One tail

Source of Variance	df	S.S	M.S	F-Ratio
Treatment	t-1	$(Ti^2/ri)-C$	S.S/df	M.S*tr
Within Treament	N-t	Tol.S.S-TrS.S	S.S/df	
TOTAL	N-i	Y^2-C		

Y = an observation

Ti = a treatment total

ri = the number of replication of the i treatment

N = ri , the total number of observations

t = the number of treatments

C = Correction factor , G^2/N

G = the grand total

ที่มา : Cochran และเพื่อน (1957)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 Analysis of Variance ของความซึ้นของเลือดไก่ เลือดปลา เลือดหมู และ ขนไก่ ก่อนทำการย่อยสลาย

SOV	df	S.S	M.S	F-Ratio
Treatment	3	772.64	96.58	1379.88*
Within Treatment	8	0.14	0.07	
TOTAL	11	772.78		

ตารางภาคผนวกที่ 5 Analysis of Variance ของโปรตีนของเลือดไก่ เลือดปลา เลือดหมู และ ขนไก่ ก่อนทำการสลาย

SOV	df	S.S	M.S	F-Ratio
Treatment	3	462.75	154.25	21.94*
Within Treatment	8	56.24	7.03	
TOTAL	11	518.99		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดไก่ที่ย่อยสลายด้วยกรดเมื่อเวลาต่าง ๆ กันโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยไบยูเรท เทสท์

SOV	df	S.S.	M.S.	F-Ratio
Treatment	3	0.00013	$4.33*10^{-5}$	0.207^{NS}
Within Treatment	11	0.00167	$2.08*10^{-4}$	
TOTAL	14	0.00180		

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดปลาที่ย่อยสลายด้วยกรดที่เวลาต่าง ๆ กันโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์

SOV	df	S.S.	M.S.	F-Ratio
Treatment	3	$1.59*10^{-4}$	$5.30*10^{-5}$	0.66^{NS}
Within Treatment	11	$6.41*10^{-4}$	$8.01*10^{-5}$	
TOTAL	14	$8.00*10^{-4}$		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดหมูที่ย่อยสลายด้วยกรดเมื่อเวลาต่าง ๆ กันโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์

SOV	df	S.S.	M.S.	F-Ratio
Treatment	3	$4.10*10^{-4}$	$1.37*10^{-4}$	0.42^{NS}
Within Treatment	11	$2.59*10^{-3}$	$3.24*10^{-4}$	
TOTAL	14	$3.00*10^{-3}$		

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของขนไก่ที่ย่อยสลายด้วยกรดเมื่อเวลาต่าง ๆ กันโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทส

SOV	df	S.S.	M.S.	F-Ratio
Treatment	3	$3.25*10^{-4}$	$1.08*10^{-4}$	0.52^{NS}
Within Treatment	11	$1.67*10^{-3}$	$2.09*10^{-4}$	
TOTAL	14	$2.00*10^{-3}$		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์สถิติของเลือดไก่ที่ย่อยสลายด้วยด่างเมื่อเวลาต่าง ๆ กันโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์

SOV	df	S.S.	M.S.	F-Ratio
Treatment	3	$5.62*10^{-4}$	$1.87*10^{-4}$	2.78^{NS}
Within Treatment	11	$5.38*10^{-4}$	$6.73*10^{-5}$	
TOTAL	14	$1.10*10^{-3}$		

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดปลาที่ย่อยสลายด้วยด่างที่เวลาต่าง ๆ กันโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์

SOV	df	S.S.	M.S.	F-Ratio
Treatment	3	$6.47*10^{-5}$	$2.16*10^{-5}$	0.21^{NS}
Within Treatment	11	$8.35*10^{-4}$	$1.04*10^{-4}$	
TOTAL	14	$9.00*10^{-4}$		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเลือดหมูที่ย่อยสลายด้วยด่างเมื่อเวลาต่าง ๆ กันโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์

SOV	df	S.S.	M.S.	F-Ratio
Treatment	3	$3.16*10^{-3}$	$1.05*10^{-3}$	3.92^{NS}
Within Treatment	11	$2.15*10^{-3}$	$2.69*10^{-4}$	
TOTAL	14	$5.31*10^{-3}$		

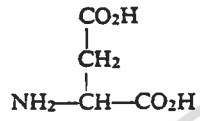
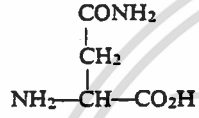
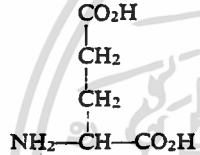
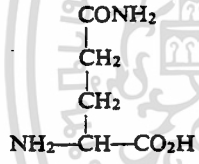
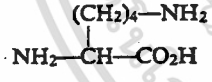
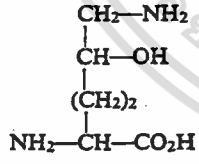
ตารางภาคผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของขนไก่ที่ย่อยสลายด้วยด่างที่เวลาต่าง ๆ กันโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีไบยูเรท เทสท์

SOV	df	S.S.	M.S.	F-Ratio
Treatment	3	$2.73*10^{-5}$	$9.1*10^{-6}$	0.05^{NS}
Within Treatment	11	$1.65*10^{-3}$	$2.06*10^{-4}$	
TOTAL	14	$1.68*10^{-3}$		

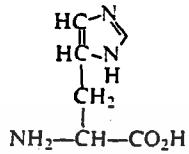
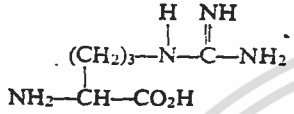
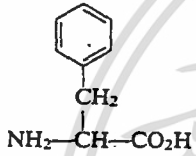
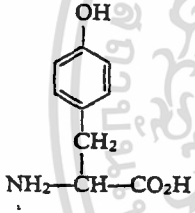
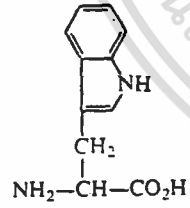
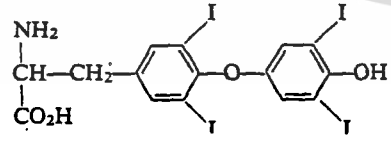
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

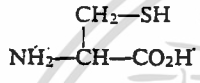
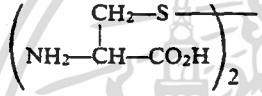
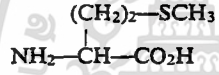
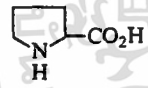
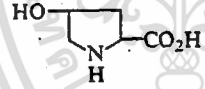
Name	*Structure*	*Values of pK_a*	*pI*	*Remarks*
I. Aliphatic amino acids				
1. Glycine (Gly)	$H_2N—CH_2—CO_2H$	2.34; 9.6	5.97	
2. Alanine (Ala)	$H_2N—\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{\vert}{CH}}—CO_2H$	2.35; 9.69	6.02	
3. Valine (Val)	$H_2N—\underset{\displaystyle \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{\vert}{CH}}—CH_3}{\underset{\vert}{CH}}—CO_2H$	2.32; 9.62	5.97	
4. Leucine (Leu)	$H_2N—\underset{\displaystyle \underset{\displaystyle \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{\vert}{CH}}—CH_3}{\underset{\vert}{CH}}—CH_2}{\underset{\vert}{CH}}—CO_2H$	2.36; 9.60	5.98	
5. Isoleucine (Ile)	$H_2N—\underset{\displaystyle \underset{\displaystyle \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{\vert}{CH}}—CH_3}{\underset{\vert}{CH}}—CH_2}{\underset{\vert}{CH}}—CO_2H$	2.36; 9.68	6.02	Has two asymmetric carbon atoms
II. Hydroxyamino acids				
6. Serine (Ser)	$H_2N—\underset{\displaystyle CH_2OH}{\underset{\vert}{CH}}—CO_2H$	2.21; 9.15	5.68	
7. Threonine (Thr)	$NH_2—\underset{\displaystyle \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{\vert}{CH}}—OH}{\underset{\vert}{CH}}—CO_2H$	2.63; 10.43	6.53	Has two asymmetric carbon atoms

ตารางภาคผนวกที่ 14 สูตรเคมี และ โครงสร้างของกรดอะมิโน

III. Dicarboxylic amino acids and their amides			
8. Aspartic acid (Asp)		2.09 (α-carboxyl); 3.86 (β-carboxyl); 9.82	2.87
9. Asparagine ($AspNH_2$) (or Asn)		2.02; 8.8	5.41
10. Glutamic acid (Glu)		2.19 (α-carboxyl); 4.25 (γ-carboxyl); 9.67	3.22
11. Glutamine ($GluNH_2$) (or Gln)		2.17; 9.13	5.65
IV. Amino acids having basic functions			
12. Lysine (Lys)		2.18; 8.95 (α-amino); 10.53 (ε-amino)	9.74
13. Hydroxylysine (Hylys)		2.13; 8.62 (α-amino); 9.67 (ε-amino)	9.15

Has two asymmetric carbon atoms; occurs only in collagen and gelatin

14. Histidine (His)		1.82; 6.0 (imidazole); 9.17	7.58	
15. Arginine (Arg)		2.17; 9.04 (α-amino); 12.48 (guanidino)	10.76	
V. Aromatic amino acids (histidine included in category IV)				
16. Phenylalanine (Phe)		1.83; 9.13	5.98	$\lambda_{max} = 259\ m\mu$ $\varepsilon_{259} = 2 \times 10^2$
17. Tyrosine (Tyr)		2.20; 9.11 (α-amino); 10.07 (phenolic hydroxyl)	5.65	$\lambda_{max} = 278\ m\mu$ $\varepsilon_{278} = 1.1 \times 10^3$
18. Tryptophan (Try)		2.38; 9.39	5.88	$\lambda_{max} = 279\ m\mu$ $\varepsilon_{279} = 5.2 \times 10^3$
19. Thyroxine				Occurs only in the protein thyroglobulin (elaborated by the thyroid gland)

VI. Sulfur-containing amino acids			
20. Cysteine (CySH)		1.71; 8.33 (sulfhydryl); 10.78 (α-amino)	5.02
21. Cystine (CyS—SCy)		1.65; 2.26 (carboxyls) 7.85; 9.85 (aminos)	5.06
22. Methionine (Met)		2.28; 9.21	5.75
VII. Imino acids			
23. Proline (Pro)		1.99; 10.60	6.10
24. Hydroxyproline (Hypro)		1.92; 9.73	5.83

Has two asymmetric carbon atoms; occurs only in collagen and gelatin

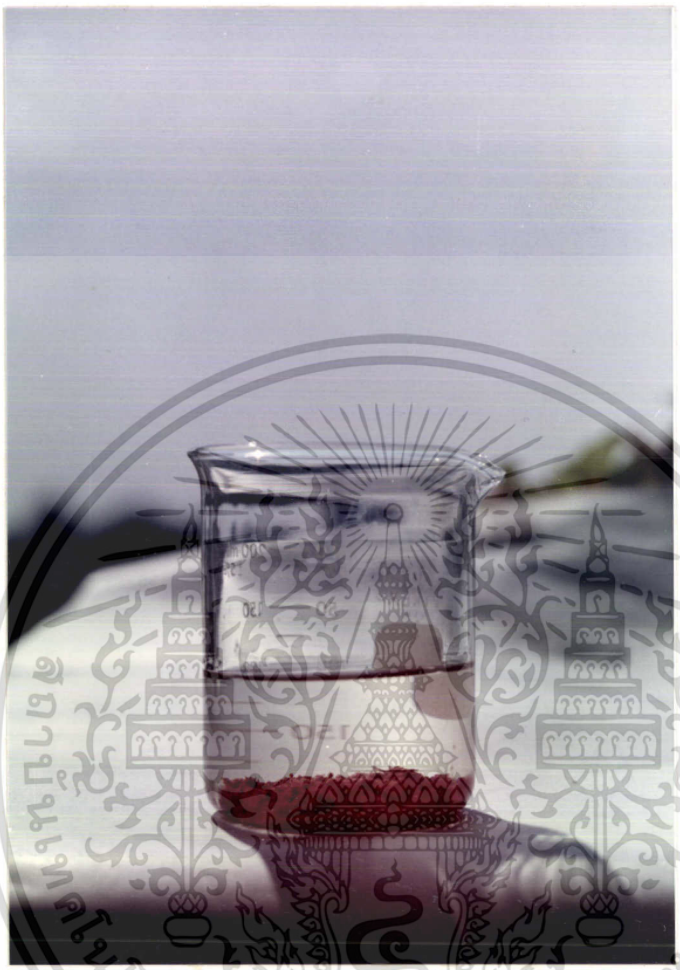
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โดยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาคผนวก ฉ

ภาพแสดงเครื่องมือ อุปกรณ์ และ ผลการวิเคราะห์

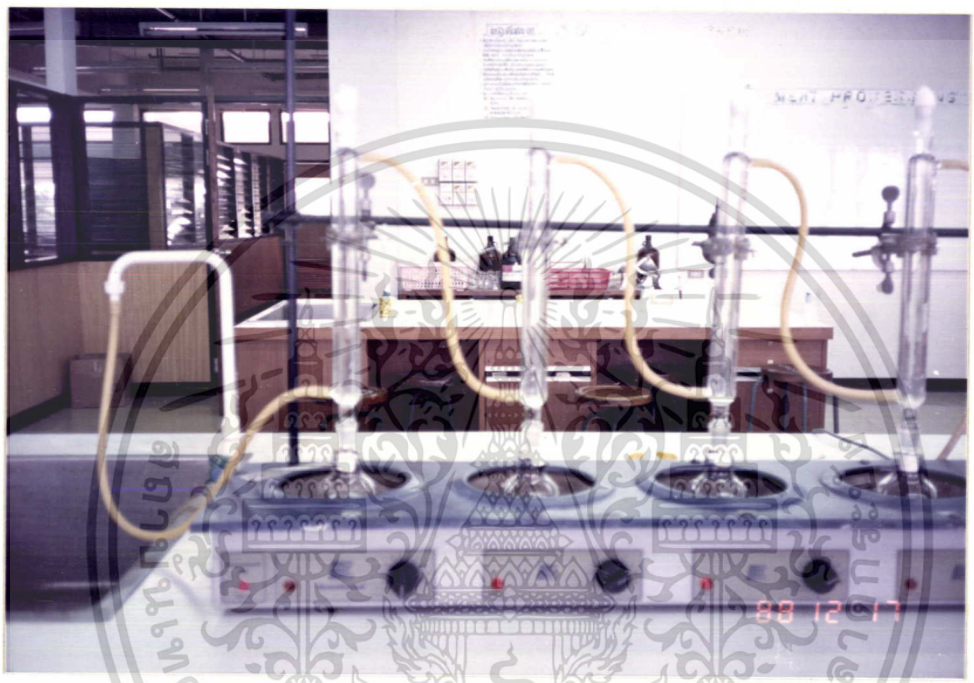
ภาพภาคผนวกที่ 7 เครื่องปั่น (Blender) แยกเม็ดเลือดที่เป็นก้อนให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



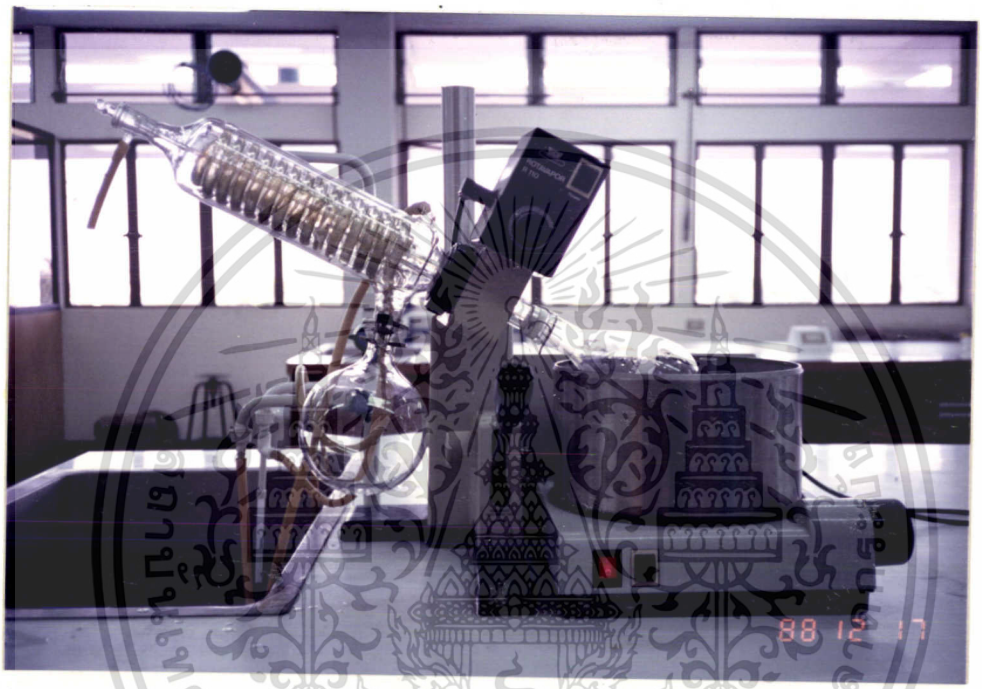
ภาพภาคผนวกที่ 8 การตกตะกอนโปรตีนทั้งหมดในเลือดด้วยอะซิโตน (Acetone)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



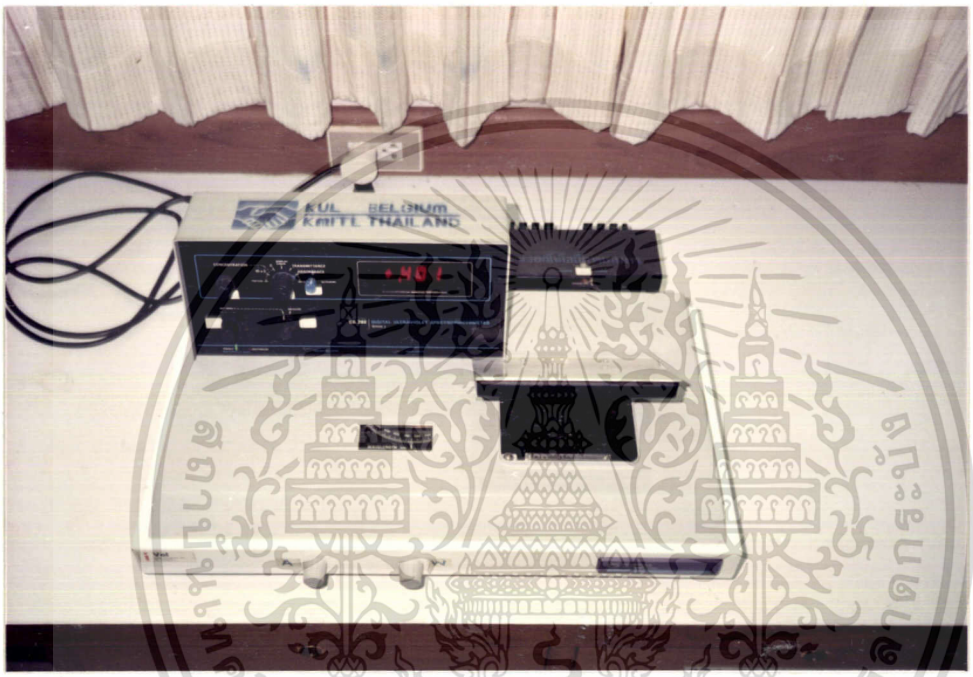
ภาพภาคผนวกที่ 9 เครื่องย่อยสลายโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



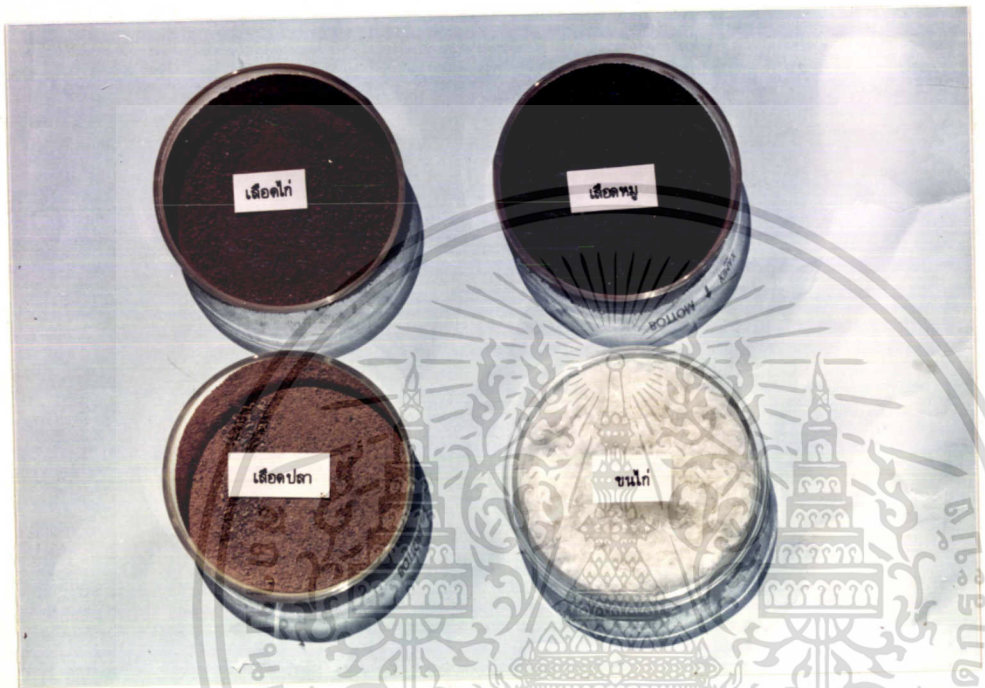
ภาพภาคผนวกที่ 10 เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (Rotory Evaporator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ 11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Visible Spectophotometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

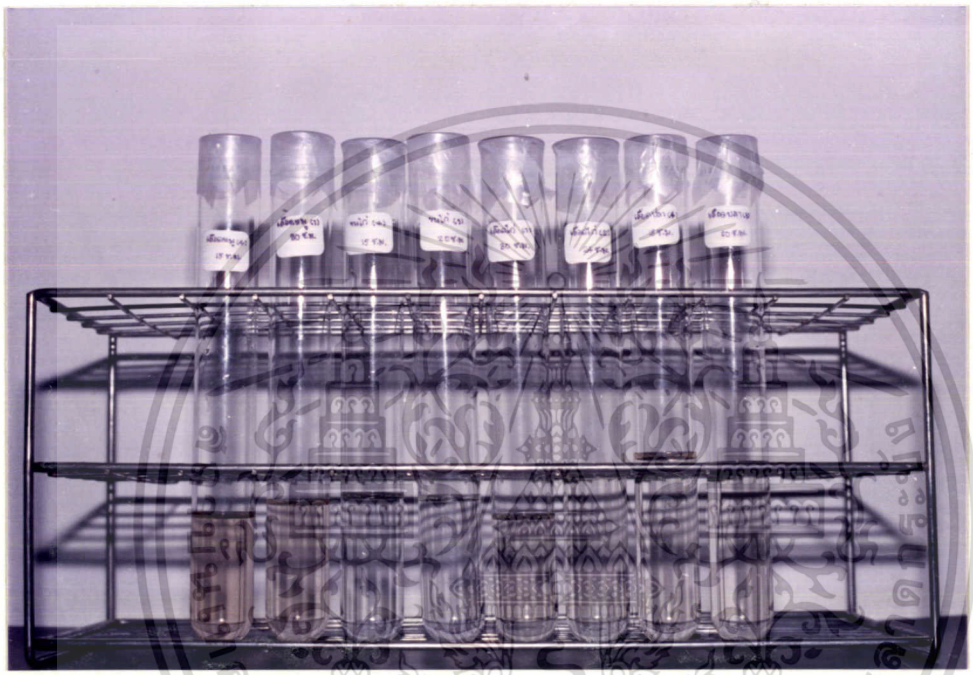


ภาพภาคผนวกที่ 12 เลือดไก่ เลือดหมู และเลือดปลา หลังอบแห้ง ทำป่นแล้ว และขนไก่ที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำมาทำการย่อยสลายต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

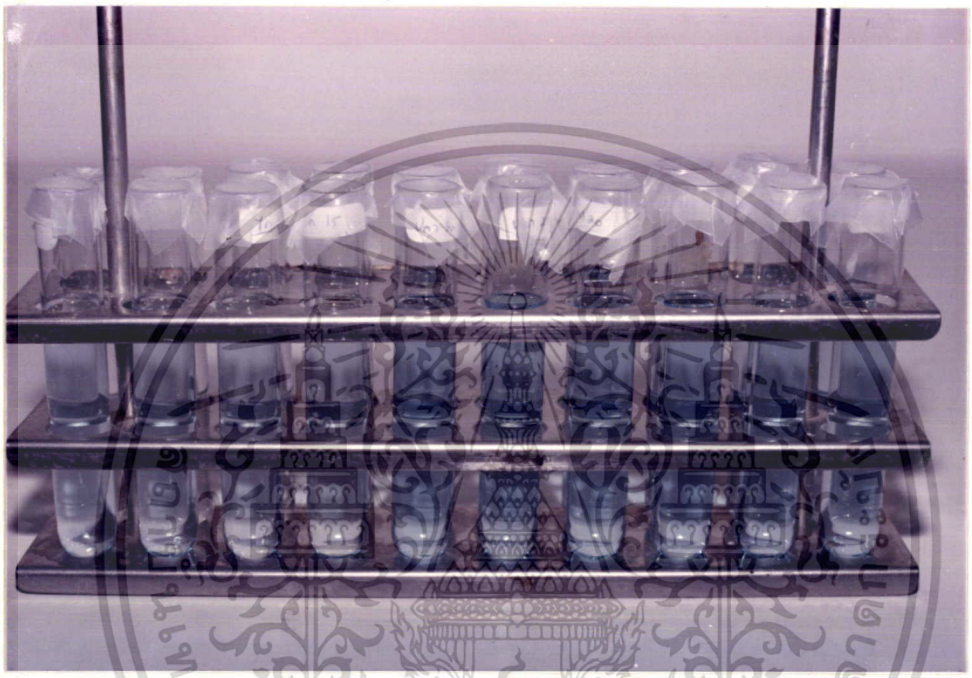
ภาพภาคผนวกที่ 13 เลือด และ ขนไก่ ภายหลังการย่อยสลายด้วยกรด เก็บไว้ในหลอดแก้วไว้ในที่เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



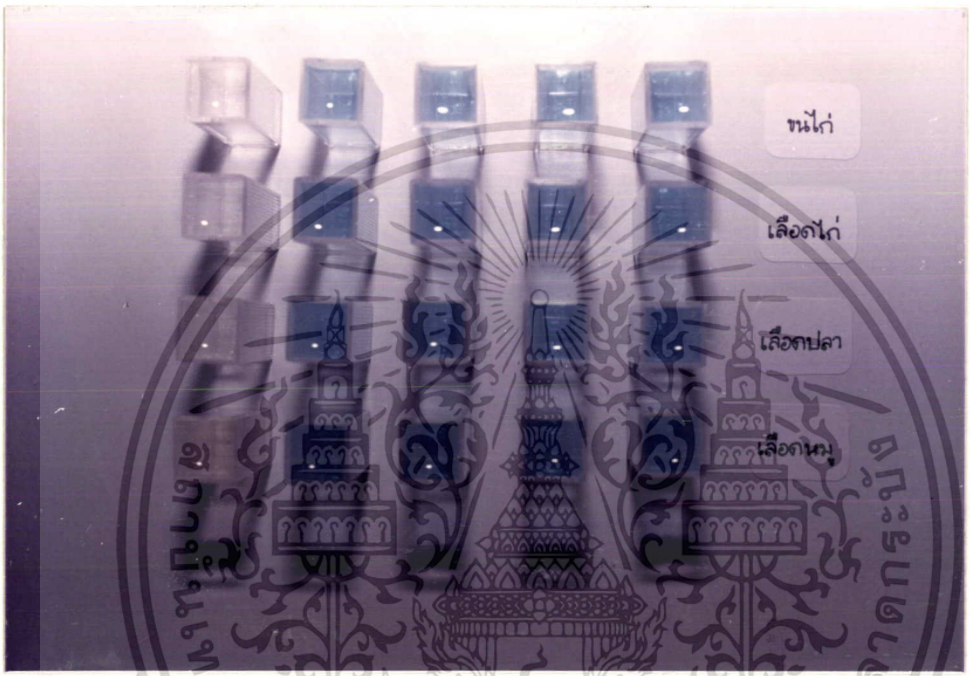
ภาพภาคผนวกที่ 14 เลือด และ ขนไก่ หลังทำการย่อยสลายด้วยด่างที่เวลาต่าง ๆ เก็บในหลอดแก้วไว้ในที่เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ 15 ตัวอย่างแลือด และ ขนไก่ นำมาทำปฏิกริยากับสารละลาย ไบยูเรท ทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ 16 ตัวอย่างเลือดและขนไก่หลังการย่อยสลายแล้ว ที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณพันธะเปปไทด์ด้วยวิธีไบยูเรท เทส์ท ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งให้สารละลายสีฟ้าใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้