ชื่อโครงการ การจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลิด
แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 100,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2555 ถึง 30 กันยายน 2556
หัวหน้าโครงการวิจัย นายสิทธิพงศ์ นลินานนท์
คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (acid solubilized collagen: ASC) จากหนังปลาสลิด (*Trichogaster pectoralis*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย การเตรียม ASC ทำได้โดยการนำตัวอย่างหนังปลามาผ่านการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน แล้วนำไปสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก ก่อนนำไปตกตะกอนด้วยเกลือเพื่อเก็บเกี่ยวคอลลาเจนตามลำดับ ทำให้ได้ปริมาณผลผลิต ASC เท่ากับร้อยละ 9.43 และ 34.65 โดยน้ำหนักฐานเปียกและฐานแห้งของตัวอย่างหนังที่ใช้ ตามลำดับ จากนั้นนำ ASC ที่ได้ไปผ่านการทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์ TOYOPEARL® CM-650M ทำให้ได้ ASC ที่มีความบริสุทธิ์สูง ดังแสดงในพีคค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่เด่นชัดที่ 230.7 นาโนเมตร โดยไม่พบค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 260-290 นาโนเมตร และยังพบไฮดรอกซีโพรลีนในปริมาณสูง (23.22±1.24 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง) การศึกษาด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีสีสแสดงให้เห็นว่า ASC ประกอบด้วยสาย γ, β, $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อพิจารณาแผนภาพความเข้มของ ASC พบว่า อัตราส่วนความเข้มของแถบโปรตีนของสาย $\gamma/(\alpha 1 + \alpha 2)$, $\beta/(\alpha 1 + \alpha 2)$ และ $\alpha 1/\alpha 2$ สามารถคำนวณได้เท่ากับ 0.45, 1.18 และ 2.37 ตามลำดับ ด้วยผลข้างต้นทำให้สามารถจำแนกคอลลาเจนที่ได้เป็นชนิด Type I ASC สามารถละลายได้ดีในช่วงพีเอช 2 ถึง 4 และการละลายมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่สภาวะพีเอชเป็นกลาง นอกจากนี้พบว่า ASC สามารถละลายได้สูงสุดในสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 2 แต่การละลายจะลดต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ดังนั้นข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มทางเลือก และสามารถนำไปประยุกต์สำหรับอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำ และอุตสาหกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

คำสำคัญ : การจำแนกคุณลักษณะ, คอลลาเจน, *Trichogaster pectoralis*, หนัง, ปลาสลิด

Research Title: Characterization of acid solubilized collagen from the skin of snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*)

Researcher: Sitthipong Nalinanon

Faculty: Agro-Industry **Department:** Agro-Industry

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the acid solubilized collagen (ASC) from the skin of snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*), an important economic freshwater fish species in Thailand. ASC was prepared by non-collagenous proteins and fat removals, extraction using acetic acid and collagen recovery by salt precipitation, respectively. The yield of ASC was 9.43% and 34.65%, based on wet weight and dry weight of the skin used, respectively. Then, ASC was subjected to partial purify using TOYOPEARL® CM-650M column chromatography. ASC had high purity which showed the distinct UV absorption peak at 230.7 nm with no absorption at 260-290 nm and high hydroxyproline content (23.22±1.24 mg/g sample). Electrophoretic study revealed that ASC comprised γ, β, $\alpha 1$ and $\alpha 2$ as the major constituents. As per the densitogram of ASC, the band intensity ratios of $\gamma/(\alpha 1 + \alpha 2)$, $\beta/(\alpha 1 + \alpha 2)$ and $\alpha 1/\alpha 2$ chains were estimated to be 0.45, 1.18 and 2.37, respectively. As a consequence, ASC could be classified as type I collagen. ASC was highly solubilized in the pH range of 2–4 and sharply decreased at the neutral pH. The highest solubility of ASC in the presence of NaCl was observed at 2% (w/v) and the decrease was more pronounced with increasing NaCl concentration. Therefore, the information gained from this work can be a promising means to gain the alternative value-added product and can be implemented in fish processing or related industries.

Keywords : Characterization, Collagen, *Trichogaster pectoralis*, Skin, snakeskin gourami

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลิด ฉบับนี้สามารถทำสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือ กำลังใจ และการสนับสนุนจากบุคคลหลายท่านตลอดมา ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทศไทย และ Assoc. Prof. Hideki Kishimura จากมหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ที่สละเวลาอันมีค่า คอยแนะนำให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆมาโดยตลอด ตลอดจนสนับสนุนการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ ผู้วิจัยขอขอบคุณคุณฐาปนี กรพานิชกุล และคุณพนัชกร เลาสภากุล นักศึกษาผู้ช่วยทำงานวิจัยในรายวิชาปัญหาพิเศษ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้ช่วยทำงานวิจัยในรายวิชาปัญหาพิเศษ ที่มีความตั้งใจและมุ่งมั่นเรียนรู้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณมารดา ภรรยา และลูก ที่คอยให้กำลังใจกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

นายสิทธิพงศ์ นลินานนท์
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มา	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ปลาสลิด	3
2.2 คอลลาเจน	5
2.3 โครงสร้างของคอลลาเจน	6
2.4 การเตรียมคอลลาเจน	7
2.5 คุณสมบัติของคอลลาเจน	8
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	12
3.1 วัตถุดิบ	12
3.2 อุปกรณ์เครื่องมือ	12
3.3 สารเคมี	13
3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง	14
3.5 วิธีการทดลอง	14
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
4.1 ปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด(ASC)จากหนังปลาสลิด	20
4.2 การดูดกลืนแสงยูวีของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด(ASC) จากหนังปลาสลิด	20
4.3 รูปแบบโปรตีนของหนังปลาสลิด และ ASC	21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อการละลายของ ASC..... 24

4.5 ผลของพีเอชต่อการละลายของ ASC..... 24

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 26

5.1 สรุปผลการวิจัย..... 26

5.2 ข้อเสนอแนะ..... 26

บทที่ 6 **สรุปผลผลิตงานวิจัย**..... 27

6.1 ผลงานนำเสนอในการประชุมวิชาการนานาชาติ..... 27

บรรณานุกรม..... 28

ภาคผนวก..... 30

ภาคผนวก ก การตรวจสอบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน..... 30

ภาคผนวก ข การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry..... 32

ภาคผนวก ค การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Biuret..... 34

ภาคผนวก ง รายละเอียดผลงานวิจัยที่ผลิตได้..... 35

ภาคผนวก จ สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย..... 39

ประวัติผู้วิจัย..... 40

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 อัตราส่วนความเข้มขององค์ประกอบต่างๆของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาสลิดปลา Ornate threadfin bream ปลา Deep-sea redfish ปลา Black drum และหนังลูกวัว..... 23

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของปลาสลิด.....	4
2.2	รูปแบบโปรตีนของASC และ PSC จากหนังปลากะพงแดงภายใต้สภาวะมีสารรีดิวซ์ และไม่มีสารรีดิวซ์.....	10
2.3	รูปแบบโปรตีนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของคอลลาเจนมาตรฐาน Type II และคอลลาเจน Type II บริสุทธิ์จากกระดูกอ่อนของไก่ทั่วไป.....	10
3.1	แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมหนังปลาสลิด.....	15
3.2	แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนด้วยกรด (ASC).....	16
3.3	การตกตะกอนและไดอะไลซีสและทำแห้งคอลลาเจนจากหนังปลาสลิด.....	17
4.1	สเปกตรัมช่วงคลื่นแสงยูวี (UV-Spectrum) ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาสลิด.....	21
4.2	รูปแบบโปรตีนของหนังปลาสลิด (SS) และคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาสลิด M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน.....	22
4.3	แผนภาพความหนาแน่น (Densitogram) ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาสลิด.....	23
4.4	ผลของความเข้มข้นของสารละลายเกลือต่อการละลายของ ASC.....	24
4.5	ผลพีเอชต่อการละลายของ ASC.....	25