

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

เนื่องจากปัจจุบันการแปรรูปพลาสติกมักทำการตากแห้งเพื่อจำหน่ายในประเทศ และมีแนวโน้มขยายไปต่างประเทศ (กรมประมง, 2554) แต่ผลิตภัณฑ์จากพลาสติกยังไม่หลากหลายนัก ดังนั้นการนำหนังพลาสติกมาสกัดคอลลาเจนถือว่าการเพิ่มผลิตภัณฑ์และมูลค่าให้กับพลาสติกอีกทางหนึ่ง ซึ่งคอลลาเจนมักพบใน เส้นเอ็น กระดูก ผิวหนัง และระบบต่อลำเลียงในสัตว์ รวมถึงแผ่นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบกล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้อเหนียว โดยโปรตีนกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีคอลลาเจนประมาณร้อยละ 10 (Foegeding, 1996) คอลลาเจนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟิล์มและฟอกหนัง วัสดุชีวเวชภัณฑ์และอาหาร (Kittiphattanabawon และคณะ, 2005) ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีการใช้คอลลาเจนเพราะมีคุณสมบัติให้ความชุ่มชื้นที่ดี (Swatschek และคณะ, 2002) คอลลาเจนสามารถใช้ผลิตผ้าพันแผล ทำรากฟันเทียม และใช้ผลิตปลูกหุ้มสำหรับการขึ้นรูปในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เนื้อ (ไส้กรอก/salami/ขนมขบเคี้ยว) (Singh และคณะ, 2011) โดยทั่วไปคอลลาเจนมักสกัดมาจากหนังหมู และกระดูกวัว เนื่องจากวัวเป็นสัตว์ต้องห้ามในศาสนาซิกข์และฮินดู ส่วนคอลลาเจนจากหมูเป็นที่ต้องห้ามในศาสนาอิสลามและยิว นอกจากนี้การฆ่าสัตว์ดังกล่าวต้องกระทำให้อุณหภูมิสูงตามหลักศาสนาอีกด้วย (Shen และคณะ, 2007) รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกยังคงมีความเสี่ยงจากไข้หวัดนก ทำให้ปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา การสกัดและการจำแนกคุณลักษณะ รวมทั้งการใช้ประโยชน์คอลลาเจนจากสัตว์น้ำ เช่น คอลลาเจนจากปลาคอดอเมริกา (Zhang และคณะ, 2007), คอลลาเจนจากหนังปลา walleye Pollock (Yan และคณะ, 2008), คอลลาเจนจากหนังปลาซวาย (Singh และคณะ, 2011) คอลลาเจนจากปลากระพงแดง (Jongjareonrak และคณะ, 2005) คอลลาเจนจากปลาฉลามกบ (Kittiphattanabawon และคณะ, 2010) เป็นต้น คอลลาเจนจากปลาจะเป็นทางเลือกในการแก้ปัญหาข้อจำกัดในการบริโภคคอลลาเจนของประชาชนได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังพลาสติกโดยวิธีการใช้กรด

1.2.2 จำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยวิธีใช้กรด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาวิธีการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสดโดยใช้กรดอะซิติก วิเคราะห์หาปริมาณผลผลิต ตรวจสอบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน การดูดกลืนแสงยูวี และรูปแบบโปรตีน รวมทั้งศึกษาการละลายของคอลลาเจนในสภาวะพีเอช และความเข้มข้นของสารละลายเกลือต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำคอลลาเจนจากหนังปลาสดไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและทางเภสัชกรรม

1.4.2 เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้วิธีการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดกับวัตถุดิบอื่นได้

1.4.3 สามารถนำผลการทดลองนี้ไปใช้ในการผลิตคอลลาเจนทางเลือกให้แก่ผู้บริโภคได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลาสลิค

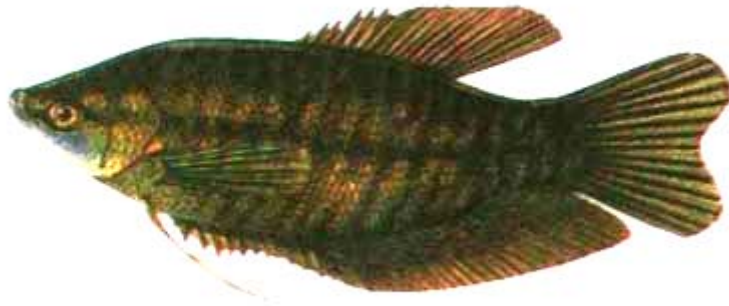
ปลาสลิค เป็นปลาน้ำจืด ซึ่งเป็นปลาพื้นบ้านของประเทศไทย มีแหล่งกำเนิดอยู่ในที่ลุ่มภาคกลาง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trichogaster pectoralis* และนิยมเลี้ยงกันมากบริเวณภาคกลาง ส่วนที่พบในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย อินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา และฟิลิปปินส์ นั้น เป็นพันธุ์ปลาที่ส่งไปจากเมืองไทย เมื่อประมาณ 80-90 ปีที่ผ่านมา (กรมประมง, 2554) มีชื่อเรียกในภาษา มาเลย์ว่า "sepat siam" ภาษาอังกฤษเรียกว่า "กระดี่หนังงู" (snakeskin gourami) และมีชื่อเรียกในราชาศัพท์ อีกว่า "ปลาใบไม้" ทั้งนี้เนื่องจากคำว่า "สลิค" เพี้ยนมาจากคำว่า "จริต" พระบาทสมเด็จพระจอมเกล้า เจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 4 จึงได้ทรงแนะนำให้เรียกปลาสลิคในหมู่ราชบริพารว่า ปลาใบไม้ เพราะทรงเห็นว่า มีรูปร่างเหมือนใบไม้ (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2555) สำหรับแหล่งปลาสลิค ที่มีชื่อเสียงเป็นที่รู้จักว่ามีรสชาติ ดี เนื้ออร่อย คือ ปลาสลิคบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการแต่ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมได้ขยายตัวอย่าง แพร่หลายทำให้น้ำ ธรรมชาติที่จะระบายลงสู่บ่อเลี้ยงปลาสลิคมีคุณสมบัติไม่เหมาะสม ส่วนพื้นที่ดินพฐา ภาคใต้ในเขตจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งเป็นดินเปรี้ยวก็สามารถใช้เป็นที่ เลี้ยงปลาสลิคได้ เพราะปลาสลิคเป็นปลา ที่เลี้ยงง่าย อดทนต่อความเป็นกรด และน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนน้อยได้ดี มีห่วงโซ่อาหารสั้นคือกินแพลงก ตอน เป็น อาหารต้นทุนการผลิตต่ำ โดยจะเลี้ยงอยู่ในนา คนเลี้ยงปลาสลิคเรียกว่า ชาวนาปลาสลิค และบ่ เลี้ยงปลาสลิคเรียก แปลงนาปลาสลิคหรือล้อมปลาสลิค กรมประมงจึงได้ส่งเสริมให้เลี้ยงปลาสลิคในพื้นที่ จังหวัดอื่น เช่น จังหวัดสมุทรสาคร เพื่อเพิ่มผลผลิตให้มีปริมาณเพียงพอต่อการบริโภค และส่งเป็นสินค้า ออกในรูปแบบผลิตภัณฑ์ปลาสลิคเค็มตากแห้ง (กรมประมง, 2554)

2.1.1 อุปนิสัย

ปลาสลิคชอบอยู่ในบริเวณที่มีน้ำนิ่ง เช่น หนอง บึง ตามบริเวณที่มีพันธุ์ไม้ น้ำ เช่น ผักแ สหาร่าย เพื่อใช้เป็นที่พักอาศัยกำบังตัวและก่อ หวดวางไข่ เนื่องจากปลาชนิดนี้โตเร็วในแหล่งน้ำธรรมชาติ ที่มีอาหารพวกพืช ได้แก่ สาหร่าย พืชและสัตว์เล็ก ๆ จึงสามารถนำปลาสลิคมาเลี้ยงในบ่อและ นาข้าวได้เป็น อย่างดี (กรมประมง, 2554)

2.1.2 รูปร่างลักษณะ

ปลาสลิคมีรูปร่างคล้ายปลากระดี่หม้อ แต่ขนาดโตกว่า ลำตัวแบนข้างมีครีบ ท้องยาว ครีบเดี่ยว สีของลำตัวมีสีเขียวออกเทาหรือมีสีคล้ำเป็น พื้น และมีริ้วดำพาดขวางตามลำตัวจากหัวถึง โคนหาง เกิดบนเส้นข้างตัวประมาณ 42-47 แถว ปากเล็กยึดหดได้ ปลาสลิคซึ่งมีขนาดใหญ่เต็มที่จะมีความ ยาว ประมาณ 20 เซนติเมตร (กรมประมง, 2554) (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของปลาสลิค

ที่มา : กรมประมง (2554)

2.1.3 การสืบพันธุ์

ลักษณะเพศ ปลาสลิคตัวผู้และตัวเมียมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถสังเกตความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดคือ ปลาตัวผู้มีลำตัวยาวเรียว สันหลัง และสันท้องเกือบเป็นเส้นตรงขนานกัน มีครีบหลังยาวจรดหรือเลยโคนหาง มีสีลำตัวเข้มและสววกว่าตัวเมีย ส่วนตัวเมียมีสันท้องยาวมนไม่ขนานกับ สันท้องและครีบหลังมนไม่ยาวจนถึงโคนหาง สีตัวจางกว่าตัวผู้ ในฤดูวางไข่ท้องจะอูมเป่งออกมาทั้งสองข้าง อัตราการปล่อยพ่อแม่พันธุ์ปลาสลิค 1 : 1 เป็น ปลาขนาดกลาง น้ำหนัก 10-12 ตัวต่อกิโลกรัม ดีที่สุด (กรมประมง, 2554)

2.1.4 แนวโน้มในอนาคต

ปลาสลิคมีแนวโน้มด้านการตลาดในอนาคตแจ่มใส เพราะปลาสลิคเป็นผลผลิตที่ตลาดต้องการสูง สามารถนำมาประกอบอาหารทั้งในรูปสด และทำเค็ม ดากแห้ง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ปลาสดตากแห้งเป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งได้ส่งเป็นสินค้าออกของประเทศอีกชนิดหนึ่ง ดังนั้น หากมีพื้นที่ที่เหมาะสมและทำการปรับปรุงเพื่อการเลี้ยงปลาสลิค จะช่วยเพิ่มปริมาณอาหารโปรตีนและเสริมรายได้ให้แก่ครอบครัวเพื่อการมีคุณภาพชีวิตที่ดี (กรมประมง, 2554)

2.1.5 การแปรรูปปลาสลิค

การทำ ปลาสลิคเค็มเป็นการแปรรูปอย่างหนึ่งซึ่งช่วยถนอมปลาสลิคให้สามารถเก็บไว้บริโภคได้เป็นเวลานานมากขึ้น และได้รับความนิยม อย่างแพร่หลายทั่วทุกภูมิภาคทั้งยังส่งเป็นสินค้าออกอีกส่วนหนึ่งด้วย (กรมประมง, 2554)

2.1.5.1 วิธีทำ

ขอดเกล็ดโดยใช้มีดหรือซ้อนสังกะสีบากเป็นฟันเลื่อย ตัดหัว ควักไส้ แยกหัวและไส้ไปบดสับเป็นอาหารเปิดหรือไก่ (สำหรับไส้ถ้าเป็นฤดูที่มีมันมากให้เก็บเตียนน้ำมัน น้ำมันปลาสดมีราดีเพราะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายอย่าง เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง สี และอาหารสัตว์) เคล้าปลาที่ทำเสร็จแล้วกับเกลือในอัตราส่วน 3 : 1 คือ ปลา 3 : เกลือ 1 หมักไว้ 1 คืน ในถังไม้ โองเกลือบ กะละมัง หรือเข่ง รุ่งเช้าก่อนพระอาทิตย์ขึ้น ล้างปลาให้สะอาดเรียง ปลาแผ่ครีบให้สวยงามบนตะแกรงไม้โปร่ง

ระยะเวลาตากแห้ง ตั้งแต่แดดเริ่มถึงเวลาประมาณ 11.00 น. ให้กลับข้างจนถึงเวลาประมาณ 15.00 น. หรือ 3 โมงเย็น จึงเก็บปลาลงเข่ง เรียงให้ดี ลักษณะนี้เรียกว่า ปลาสด ซึ่งเนื้อจะนุ่ม ถ้าต้องการปลาแห้งกว่านี้ ตากจนถึงเย็น แล้วใช้พลาสติกคลุมไว้ตลอดคืน รุ่งเช้าเอาผ้าพลาสติกออก ตากต่อ จนถึงเย็นโดยกลับปลาในตอนกลางวันเช่นเดิม ปลาชนิดนี้เรียกว่า ปลาสองแดด เนื้อจะแห้งแข็ง เวลาทอดจะกรอบเคี้ยวได้เกือบหมดทั้งตัว

2.1.5.2 วิธีการรับประทานปลาสด

การทอด ถ้าจะให้ดีขึ้นควรนึ่งก่อน ค่อย ๆ แซะก้างใหญ่ตรงกลางออก ประคบไว้เหมือนเดิมแล้วทอดจะได้ปลาสดไม่มีก้างกิ้นอร่อยหรือ ทอดอย่าให้สุก ทูบตรงสันหลังปลาเบา ๆ อย่าให้หนังฉีก นำลงทอดใหม่เนื้อปลาจะฟู อร่อย ถ้าจะให้อร่อยยิ่งขึ้นให้ทอดกรอบแคะเอาแต่เนื้อมายำกับมะม่วง ใส่มะพร้าว หอม กระเทียม ใบสะระแหน่ และมะม่วงสับ ชิมรสตามชอบ (กรมประมง, 2554)

2.2 คอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีนเส้นใย (fibrous protein) มีมากกว่า 28 ชนิด จะถูกระบุชนิดเป็น Type I-XXVIII จากสัตว์ชนิดต่างๆ ในแต่ละชนิดจะมีลำดับของกรดอะมิโน และโครงสร้างของโมเลกุลที่โดดเด่นแตกต่างกันไป (Liu และคณะ, 2010; Shoulders และ Raines, 2009) คอลลาเจนพบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น เส้นเอ็น กระดูก ผิวหนัง ระบบท่อลำเลียงในสัตว์ รวมถึงแผ่นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบกล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้อเหนียว (Foegeding, 1996) โดยเป็นส่วนประกอบหลักๆ ของชั้นผิวหนัง ทำหน้าที่เป็นตัวประสานเนื้อเยื่อของผิวหนังเข้าด้วยกัน (Ikoma และคณะ, 2003) ในอวัยวะของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Liu และคณะ, 2010; Shoulders และ Raines, 2009) โปรตีนกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีคอลลาเจนประมาณร้อยละ 10 ส่วนในปลาจะพบคอลลาเจนมีปริมาณน้อยกว่า คอลลาเจนมีหลายชนิด ทั้งที่ละลายในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง สารละลายกรด และบางชนิดก็ไม่ละลายในสารละลายชนิดใด (Foegeding, 1996) คอลลาเจนชนิด Type I จะมีโครงสร้างที่พันเกลียวกันสามสายภายในเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างไกลซีนและกลุ่มของเอไมด์ ในห่วงโซ่สามสายที่พันเกลียวกัน เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้คอลลาเจนมีความคงตัวมากยิ่งขึ้น (Dai และ Eitzkorn, 2009; Shoulders และ Raines, 2009) คอลลาเจนชนิด Type I มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านอุตสาหกรรมอาหาร ด้านเครื่องสำอาง ด้านยา ด้านการแพทย์วิศวกรรมเนื้อเยื่อและการย่อยสลายทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี (Liu และคณะ, 2010)

2.3 โครงสร้างของคอลลาเจน

หน่วยย่อยของคอลลาเจนคือ โทรโปคอลลาเจน (tropocollagen subunit) มีลักษณะเป็นแท่งยาวประมาณ 300 นาโนเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 นาโนเมตร ประกอบขึ้นด้วยสาย โพลีเปปไทด์ 3 สาย เรียกว่า α -chain หมุนเป็นเกลียวเวียนซ้ายในลักษณะ Triple helix โดยมีพันธะไฮโดรเจนทำให้เกิดความคงตัวภายในโครงสร้าง α -chain แต่ละสายมีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน ดังนั้นมวลโมเลกุลทั้งหมดของคอลลาเจนคือประมาณ 300,000 ดาลตัน (Foegeding, 1996) หน่วยย่อยโทรโปคอลลาเจนเข้ามารวมกันเองเป็นลักษณะเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) สายเกลียวทั้งสามสายยังสามารถเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างสาย และระหว่างหน่วยย่อยด้วยกันทำให้เกิดคอลลาเจนชนิดต่างๆ ที่พบได้ในเนื้อเยื่อที่เจริญเต็มที่แล้ว ในลักษณะที่คล้ายกับแอลฟาเคอราตินในเส้นผม (ทวิเม, 2551) การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในแต่ละสาย เกลียวทั้งสามสายของหน่วยย่อยคอลลาเจนมีลักษณะพิเศษ ลำดับของกรดอะมิโนมักเป็น Gly-X-Pro หรือ Gly-X-Hyp (ในที่นี้ Gly คือ ไกลซีน Pro คือ โพรลีน Hyp คือ ไฮดรอกซีโพรลีน และ X คือ กรดอะมิโนอื่นๆ ทั้งนี้อาจพบรูปแบบ Gly-Pro-Hyp เช่นกัน โครงสร้างที่มีหน่วยซ้ำ ๆ กันแบบนี้และมีปริมาณไกลซีนมาประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด ซึ่งสามารถพบได้ในโปรตีนชนิดเส้นใยอื่น ๆ เพียงไม่กี่ชนิด เช่น ไฟโบรอินของไหมและอีลาสติน คอลลาเจนเป็นหนึ่งในโปรตีนเพียงไม่กี่ชนิดที่มีไฮดรอกซีไลซีน และคอลลาเจนยังเป็นโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่มีไฮดรอกซีโพรลีนสูง ดังนั้นจึงมักใช้ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนเพื่อบอกริมาณคอลลาเจนในอาหาร (Foegeding, 1996) สายเกลียวทั้งสามอัดกันแน่นภายใต้แรงดึง ด้านทานการยืดจึงทำให้คอลลาเจนไม่ยืด เพราะไกลซีนเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุดจึงมีบทบาทเด่นในโปรตีนโครงสร้างที่เป็นเส้นใย ในคอลลาเจนไกลซีนจะอยู่ในทุกๆ ตำแหน่งที่สาม ยกเว้นกรดอะมิโนที่ 14 ตัวแรกจากปลายในโทรเจน และกรดอะมิโนที่ 10 ตัวแรกจากปลายคาร์บอนของโมเลกุลของคอลลาเจน เพราะการรวมตัวของสายเกลียวสามสายจะเก็บส่วนนี้ไว้ด้านในของสายเกลียว อันเนื่องมาจากพื้นที่จำกัดของโครงสร้างคอลลาเจนมีกรดอะมิโนโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนสูง ทำให้โครงสร้างเกลียวของคอลลาเจนแตกต่างจากเกลียวแอลฟา (α -helix) ทั่วไป โดยเกลียวของคอลลาเจนมีลักษณะวนซ้ายและมีกรดอะมิโน 3 ตัวต่อเกลียว 1 รอบ ในขณะที่เกลียวแอลฟาทั่วไปเป็นเกลียววนขวาและมีกรดอะมิโน 3.6 ตัวต่อรอบ โมเลกุลคอลลาเจนจะเชื่อมต่อกันทั้งจากปลายและด้านข้าง ทำให้เกิดคอลลาเจนไฟเบอร์ ซึ่งอาจเรียงตัวขนานกันเพื่อให้เกิดความแข็งแรง เช่น เส้นเอ็น หรือเรียงตัวเป็นแขนงและไม่เป็นระเบียบ เช่น ผิวหนัง (Foegeding, 1996; Nelson, 2005) โดยเกิดการเชื่อมข้าม (Cross link) มาจากพันธะโคเวเลนต์จากหมู่อัลดีไฮด์และโมเลกุลของไลซีน lysine ซึ่งทำการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ lysyl oxidase (Ally และคณะ, 2011) ส่วนวงแหวนของโพรลีนและไฮโดรโพรลีนจะขี้ออกจากสายเกลียว กรดอะมิโนทั้งสองนี้ช่วยให้หน่วยย่อยโทรโปคอลลาเจนเสถียรต่อความร้อน ในกระดูกสายเกลียวสามเส้นที่ควมกันจะวางซ้อนกันเป็นแถวหลวมๆ ช่องว่างระหว่างปลายของหน่วยย่อยโทรโปคอลลาเจนอยู่ห่างกัน 40 นาโนเมตร ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นใจกลาง (นิวเคลียส) สำหรับผลึกของเกลือแร่ซึ่งมีลักษณะละเอียดแข็ง และยาวมาจับกัน ได้แก่ ผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) ที่มี

ฟอสเฟตอยู่ด้วย กระจกอ่อนอาจกลายเป็นกระจกได้ด้วยวิธีนี้ คอลลาเจนให้ความยืดหยุ่นแก่กระจกจึงมีส่วนช่วยป้องกันกระจกแตก (ทวิม, 2551)

2.4 การเตรียมคอลลาเจน

การเตรียมคอลลาเจนจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของทั้งสัตว์บกและสัตว์น้ำโดยทั่วไปมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

2.4.1 การเตรียมวัตถุดิบ

ทำการเตรียมตัวอย่างโดยตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ แขนงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 10 (w/v) แล้วกวนอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และทำการเปลี่ยนสารละลายทุก 2 ชั่วโมง (Singh และคณะ, 2011) เช่นเดียวกับวิธีของ Kittiphattanabawon และคณะ (2005) และ Nalinanon และคณะ (2007) ส่วนการเตรียมตัวอย่างปลากระพงแดงใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 30 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนสารละลายทุก 8 ชั่วโมง (Jongjareonrak และคณะ, 2005) เพื่อกำจัดส่วนของโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและเม็ดสีออก จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำเย็นหรือน้ำกลั่นเพื่อทำให้ฟิเอชเป็นกลาง ก่อนนำไปทำการกำจัดส่วนที่เป่าไขมันออกด้วยการสกัดโดยบิวทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) (Nagai และ Suzuki, 2000; Kittiphattanabawon และคณะ, 2010) ส่วนการกำจัดไขมันในตัวอย่างจากปลากระพงแดงใช้บิวทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 1:30 (w/v) (Jongjareonrak และคณะ, 2005)

2.4.2 การสกัดคอลลาเจน

โดยทั่วไปทำการสกัดคอลลาเจนจากตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและไขมันด้วยกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ด้วยอัตราส่วน 1 : 15 (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Nagai และ Suzuki, 2000) การสกัดคอลลาเจนจากปลากระพงแดงใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อกรดอะซิติก 1 : 30 (w/v) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Jongjareonrak และคณะ, 2005) จากนั้นทำการกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น ส่วนของสารละลายที่กรองได้เป็นสารละลายคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (Acid solubilized collagen ; ASC) ส่วนกากที่เหลือนำมาแช่กรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:15 (w/v) โดยมีการใช้เปปซินปริมาณ 20 หน่วย/กรัม ตัวอย่าง (Singh และคณะ, 2011; Kittiphattanabawon และคณะ, 2010) หรือใช้เปปซินใช้ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อช่วยในการสกัดคอลลาเจน (Jongjareonrak และคณะ, 2005) ทำการกวนสกัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น โดยส่วนของสารละลายที่กรองได้ คือ สารละลายคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน หรือ (Pepsin solubilized collagen ; PSC)

2.4.3 การตกตะกอน

ทำการตกตะกอนคอลลาเจนจาก ASC โดยการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.6 โมลาร์ ในสภาวะที่มี 0.05 โมลาร์ tris(hydroxymethyl) aminomethane (Singh และคณะ, 2011; Kittiphattanabawon และคณะ, 2010 ; Jongjareonrak และคณะ, 2005) จากนั้นปรับพีเอช

ของสารละลายคอลลาเจนให้ได้เท่ากับ 7.5 ก่อนนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 20,000g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะทำให้สามารถเก็บเกี่ยวคอลลาเจนได้ในส่วนของตะกอนจากการหมุนเหวี่ยง

2.4.4 การทำแห้ง

ทำการละลายตะกอนคอลลาเจนที่เก็บเกี่ยวได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในปริมาตรต่ำสุดเมื่อคอลลาเจนละลายอย่างสมบูรณ์ นำไปไดอะไลซ์ด้วย กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วนประมาณ 25-50 เท่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเกลือออกจากคอลลาเจน (Nagai และ Suzuki, 2000 ; Kittiphattanabawon และคณะ, 2010) จากนั้นทำการไดอะไลซ์ต่อเนื่อง เพื่อกำจัดกรดอะซิติกออกจากคอลลาเจน (Nagai และ Suzuki, 2000 ; Kittiphattanabawon และคณะ, 2010) แล้วนำ คอลลาเจนที่ได้ไปทำการระเหิดแห้ง (freeze dried) จนได้คอลลาเจนที่เตรียมสำหรับการใช้งานหรือการวิเคราะห์

2.5 คุณสมบัติของคอลลาเจน

2.5.1 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

ไฮดรอกซีโพรลีนเป็นกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นเมื่อมีการย่อยของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโพรตีน เช่น คอลลาเจน (ประมาณร้อยละ 14 โดยน้ำหนัก) และอีลาสติน ซึ่งเป็นหนึ่งในกรดอะมิโนที่เรียกว่า กรดอะมิโนไม่จำเป็น คือสัตว์สามารถสังเคราะห์ได้จากกรดกลูตามิกและไม่จำเป็นต้องมาจากแหล่ง อาหาร (Britannica Encyclopædia, 2012) โดยโพรลีนจะเปลี่ยนเป็นไฮดรอกซีโพรลีนได้ต้องมีวิตามินซี ช่วยในการสังเคราะห์ (อัญชลินทร์ สิงห์คำ, 2554) โครงสร้างโมเลกุลของไฮดรอกซีโพรลีนมีกลุ่มอะมิโนรอง (>NH) มากกว่ากลุ่มอะมิโนหลัก (-NH₂) ซึ่งไฮดรอกซีโพรลีนต่างกับโพรลีนตรงหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) โดยไฮดรอกซีโพรลีนถือเป็นองค์ประกอบหลักของคอลลาเจนและมีความสำคัญต่อความเสถียรของคอลลาเจน รวมถึงทำให้คอลลาเจนบิดเป็นเกลียวอีลิคซ์ (Kotch และคณะ, 2008) จากการวิจัยของ Nagai และคณะ(2002) พบว่า คอลลาเจนจากหนังปลา Walleye Pollock มีระดับของการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กับโพรลีน

ร้อยละ 37.5 คล้ายกับคอลลาเจนจากหนังปลาปักเป้าที่มีระดับของการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กับโพรลีน ร้อยละ 39 (Nagai และคณะ, 2002) แต่ยังต่ำกว่าการเติมหมู่ไฮดรอกซิลแก่โพรลีนที่พบปลาอุกชอง (ร้อยละ 43) (Liu และคณะ, 2007) และ ปลาหมึก (ร้อยละ 48) (Nagai และคณะ, 2001)

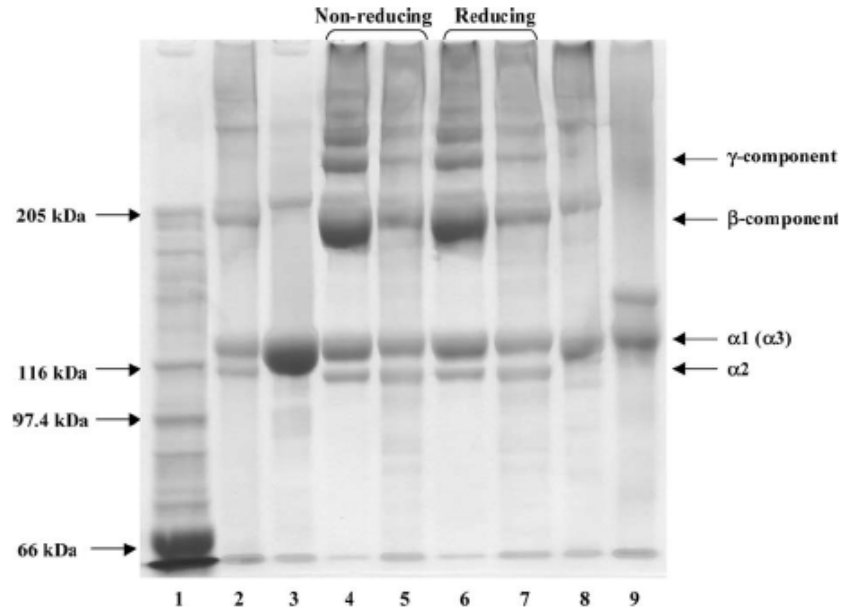
2.5.2 การดูดกลืนแสงยูวี

คอลลาเจนมักดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 220-230 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากหมู่ คาร์บอนิลเอไมด์ในพันธะเปปไทด์ โพรตีนโดยทั่วไปมีไทโรซีนและฟีนอลอาลานีนซึ่งเป็นโครโมฟอร์ที่ไวต่อการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 283 นาโนเมตร และ 251 นาโนเมตรตามลำดับ (Liu และ Liu, 2006) อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปคอลลาเจนมีปริมาณไทโรซีน และฟีนอลอาลานีนต่ำมาก การไม่พบการดูดกลืนแสงที่คลื่นแสงช่วง 250-290 นาโนเมตร จึงบ่งบอกความบริสุทธิ์ของคอลลาเจนได้ในระดับหนึ่ง สอดคล้องกับคอลลาเจนจาก

หนังปลา Walleye pollock ที่สามารถดูคลื่นแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 220-230 นาโนเมตร และมีการดูคลื่นแสงเกิดขึ้นเล็กน้อยที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (Yan และคณะ, 2008)

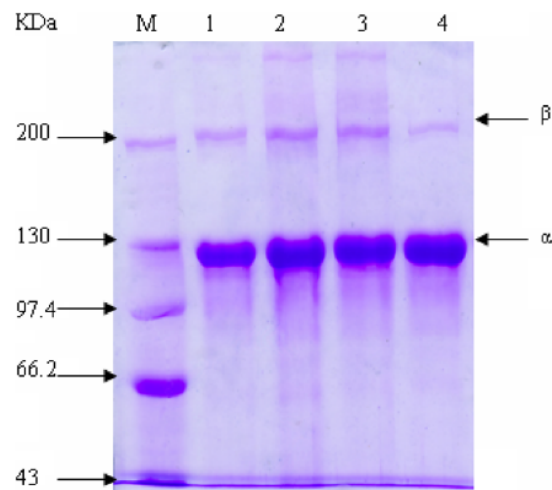
2.5.3 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน

โดยทั่วไปคอลลาเจนที่พบมีทั้งหมดประมาณ 28 ชนิด โดยมี 5 ชนิดที่พบมากที่สุดแก่คอลลาเจน Type I พบบริเวณผิวหนังและเป็นองค์ประกอบหลักของกระดูก เส้นเอ็น และหลอดเลือด คอลลาเจน type II เป็นองค์ประกอบหลักของกระดูกอ่อน ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อดูคลื่นความสะท้อน และยึดหยุ่นกับความเค้นได้ (Gelse และคณะ, 2003) คอลลาเจน Type III เป็นองค์ประกอบหลักของเส้นใยไขว้กันเหมือนแห มักพบอยู่ร่วมกับคอลลาเจน Type I คอลลาเจน Type VI เป็นรูปแบบพื้นฐานของเยื่อหุ้มเซลล์ และคอลลาเจน Type V พบที่พื้นผิวเซลล์เส้นผมและรก (Wikipedia, 2010) โดยทั่วไปคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ เช่น คอลลาเจนจากหนังปลาสาวย (Singh และคณะ, 2011) ปลาฉลามกบ (Kittiphattanabawon และคณะ, 2010) และปลา walleye Pollock (Yan และคณะ 2008) ประกอบด้วยสาย α 1 และ α 2 ในอัตราส่วน 2:1 เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟลิซิส (electrophoresis) ของคอลลาเจนจากหนังลูกวัว ทำให้สามารถจำแนกคอลลาเจนจากปลาทั้งสามชนิดได้เป็นคอลลาเจน Type I นอกจากนี้ Jongjareonrak และคณะ (2005) พบว่า คอลลาเจนจากปลากะพงแดงมีลักษณะใกล้เคียงกับคอลลาเจนมาตรฐาน Type I เช่นกัน ภาพที่ 2.2 สำหรับคอลลาเจนจากเท้า เอ็น และหนังของไก่แสดงรูปแบบของคอลลาเจนเช่นเดียวกับคอลลาเจนมาตรฐาน Type I แต่สาย α ของคอลลาเจนจากเท้าไก่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าเล็กน้อย (มณี วิทยานนท์, 2551) ส่วนคอลลาเจนจากกระดูกอ่อนของสะโพกไก่พบว่าเป็นคอลลาเจนชนิด Type II ประกอบด้วยสาย α และสาย β ซึ่งมีหน่วยย่อยที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 110 kDa ในรูปแบบคล้ายกับคอลลาเจนมาตรฐาน Sigma-Aldrich type II (Beck และ Brodsky, 1998; Helen และ Cahir, 2005; Pieper และ Van, 2002) ซึ่งแสดงดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.2 รูปแบบโปรตีนของ ASC และ PSC จากหนังปลากะพงแดง ภายใต้สภาวะมีสารรีดิวซ์ และไม่มีสารรีดิวซ์ โดยแถวที่ 1 คือ มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2, 3, 8 และ 9 คือคอลลาเจน Type I II III และ V ตามลำดับ แถวที่ 4 และ 5 คือ ASC และ PSC ภายใต้สภาวะที่ไม่มีสารรีดิวซ์ ตามลำดับ และแถวที่ 6 และ 7 คือ ASC และ PSC ภายใต้สภาวะที่มีสารรีดิวซ์ ตามลำดับ

ที่มา : Jongjareonrak และคณะ (2005)



ภาพที่ 2.3 รูปแบบโปรตีนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของคอลลาเจนมาตรฐาน Type II (แถวที่ 1) และคอลลาเจน Type II บริสุทธิ์จากกระดูกอ่อนของไก่ทั่วไป (แถวที่ 2) แถวที่ 3 และ 4 คือ คอลลาเจน Type II บริสุทธิ์จากกระดูกอ่อน และกระดูกสันอก ตามลำดับ และ M คือโปรตีนมาตรฐาน

ที่มา : Cao และ Xu (2008)

2.5.4 คุณสมบัติการละลายของคอลลาเจน

2.5.4.1 การละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

Singh และคณะ (2011) ศึกษาการละลายของคอลลาเจนจากหนังปลาสาวยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-6 พบว่าคอลลาเจนจากหนังปลาสาวยสามารถละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 0-2 แต่การละลายลดลงเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มเป็นร้อยละ 3 และลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 4 หรือสูงกว่านั้น ($P < 0.05$) เช่นเดียวกับการละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ของคอลลาเจนจากหนังปลาดาทาหวาน และหนังปลากระพงแดง (Jongjareonrak และคณะ, 2005 ; Kittiphattanabawon และคณะ, 2005 ; Montero และคณะ, 1991) การละลายที่ลดลงของคอลลาเจนสามารถอธิบายได้ด้วยปรากฏการณ์ 'salting out' ของโปรตีน ซึ่งพบในความเข้มข้นเกลือสูง (Asghar และ Henrickson, 1982) ความแรงของไอออนที่เพิ่มขึ้นเป็นเหตุให้การละลายของโปรตีนลดลงด้วยการเปลี่ยนแปลงส่วนชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ซึ่งเป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายโปรตีนและไอออนเกลือในน้ำ นำไปสู่การตกตะกอนโปรตีน (Vojdani, 1996) นอกจากนี้ความแตกต่างในการละลายในสารละลายเกลือของโปรตีนเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบกรดอะมิโนและโครงสร้างของคอลลาเจนที่ต่างกัน

2.5.4.2 อิทธิพลของพีเอชต่อการละลายของคอลลาเจน

จากการทดลองทำการละลายคอลลาเจนจากหนังปลาสาวยในสารละลายที่มีพีเอชต่างกัน ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 1-10 ของ Singh และคณะ (2011) พบว่าคอลลาเจนจากหนังปลาสาวยละลายได้สูงสุดที่พีเอช 2 และละลายได้ต่ำสุดเมื่อพีเอชประมาณ 7 ซึ่งใกล้เคียงกับการละลายคอลลาเจนจากกล้ามเนื้อและหนังปลาเทราท์ (Montero และคณะ, 1991) และคอลลาเจนจากหนังปลากระพงแดง (Jongjareonrak และคณะ, 2005) โดยทั่วไปคอลลาเจนละลายได้ดีในสารละลายกรดที่มีพีเอชประมาณ 1-4 และมักพบว่าการละลายลดลงเมื่อช่วงพีเอชเป็นกลางและเป็นเบส โดยพีเอชที่สูงกว่าหรือต่ำกว่า pI ทำให้ประจุสุทธิของโมเลกุลโปรตีนเป็นบวกหรือลบ จะทำให้คอลลาเจนสามารถละลายได้ดีขึ้นด้วยแรงผลักระหว่างสายโพลีเปปไทด์ (Vojdani, 1996) ในทางตรงกันข้ามเมื่อประจุสุทธิเป็นศูนย์ เกิดการเปลี่ยนแปลงของส่วนชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ส่งผลให้สายโปรตีนเกิดอันตรกิริยากันมากขึ้น นำมาสู่การตกตะกอนที่ pI โดยคอลลาเจนทั่วไปมักมี pI ในช่วงพีเอช 6 ถึง 9 (Foegeding และคณะ, 1996)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

พลาสติก ซึ่มาจากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ขนาดประมาณ 6-8 ตัวต่อกิโลกรัม ถูกบรรจุอยู่ในถุงพลาสติก เก็บในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งในอัตราส่วน 1:2 ขนส่งมาที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายในเวลา 1.5 ชั่วโมง เมื่อมาถึงนำพลาสติกมาทำการแกะเอาเฉพาะหนังจากนั้นกำจัดเศษเนื้อออกก่อนนำไปทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นนำหนังที่ได้บรรจุในถุงพลาสติกพอลิเอทิลีนแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กรรไกร
2. หม้อ
3. กระชอน
4. เครื่องกวน ใบพัดสามแฉก
5. ผ้าขาวบาง
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Sorvall Legend march รุ่น 1.6 R centrifuge, USA)
7. ถุงไดอะไลซิส (Dialysis bag)
8. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer) (IKA, รุ่น C-MAG HS7 China)
9. เครื่องทำแห้งแบบระเหิด (Freeze dryer) (LAB CONCO, 7755501, USA)
10. ตู้แช่แข็ง (Freezer)
11. ถุงพลาสติก
12. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
13. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, German)
14. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, German)
15. เครื่องปั่น (Blender)
16. ที่คีบ (Tong)
17. โถดูดความชื้น
18. เตาเผาไฟฟ้า (Nabertherm, Model LT40/11/B170, Germany)
19. ตู้อบลมร้อน Hot air oven (Mettmert Um 400, Germany)
20. เครื่องกลั่น (Distillation Unit รุ่น Vapodest 30 Gerhardt, Denmark)

21. เครื่องสกัดไขมัน (Gerhardt, รุ่น S 306 AK, Denmark)
22. พีเอชมิเตอร์ (pH meter) (CG 842 Shott, German)
23. กระดาษวัดพีเอช 0-14 (pH paper)
24. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo, รุ่น S-650, USA)

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodiumhydroxide)
2. บิวทานอล (Butanol)
3. กรดอะซิติก (Acetic acid)
4. เอนไซม์เปปซิน (Pepsin)
5. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)
6. ทริซ(ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน (Tris (hydroxymethyl) aminomethane)
7. น้ำกลั่น (Distilled water)
8. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
9. กรดบอริก (Boric acid)
10. กรดซัลฟูริก เข้มข้น (Conc. Sulfuric acid)
11. Bromocresol green
12. ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) ที่มีจุดเดือด 40-60 °ซ
13. Bovine serum albumin (BSA)
14. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
15. Beta-Mercaptoethanol (β -ME)
16. Molecular weight markers
17. Acrylamide และ tris-acrylamine
18. TEMED
19. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammoniumpersulfate)
20. กลีเซอรอล (Glycerol)
21. Coomassie brilliant blue R-250
22. เมทานอล (Methanol)
23. เอทานอล (Ethanol)
24. Standard collagen type I, type II, type III

3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.2 การศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสด

สกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสด โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nalinanon และคณะ (2007) การสกัดในแต่ละขั้นตอนจะดำเนินการที่อุณหภูมิ 4 °C ตลอดกระบวนการ

3.5.2.1 การเตรียมตัวอย่างหนังปลาสดสำหรับการสกัดคอลลาเจน

การเตรียมตัวอย่างเริ่มโดยนำหนังปลาสดมาทำการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 15 (w/v) เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุก 2 ชั่วโมง) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งตัวอย่างมีพีเอชเป็นกลาง ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นนำไปสกัดแยกไขมันออกด้วยสารละลายบิวทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุก 6 ชั่วโมง) แล้วนำตัวอย่างไปล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดบิวทานอลออก ทั้งนี้ขั้นตอนเตรียมตัวอย่างได้สรุปเป็นแผนภาพดังแสดงในภาพที่ 3.1

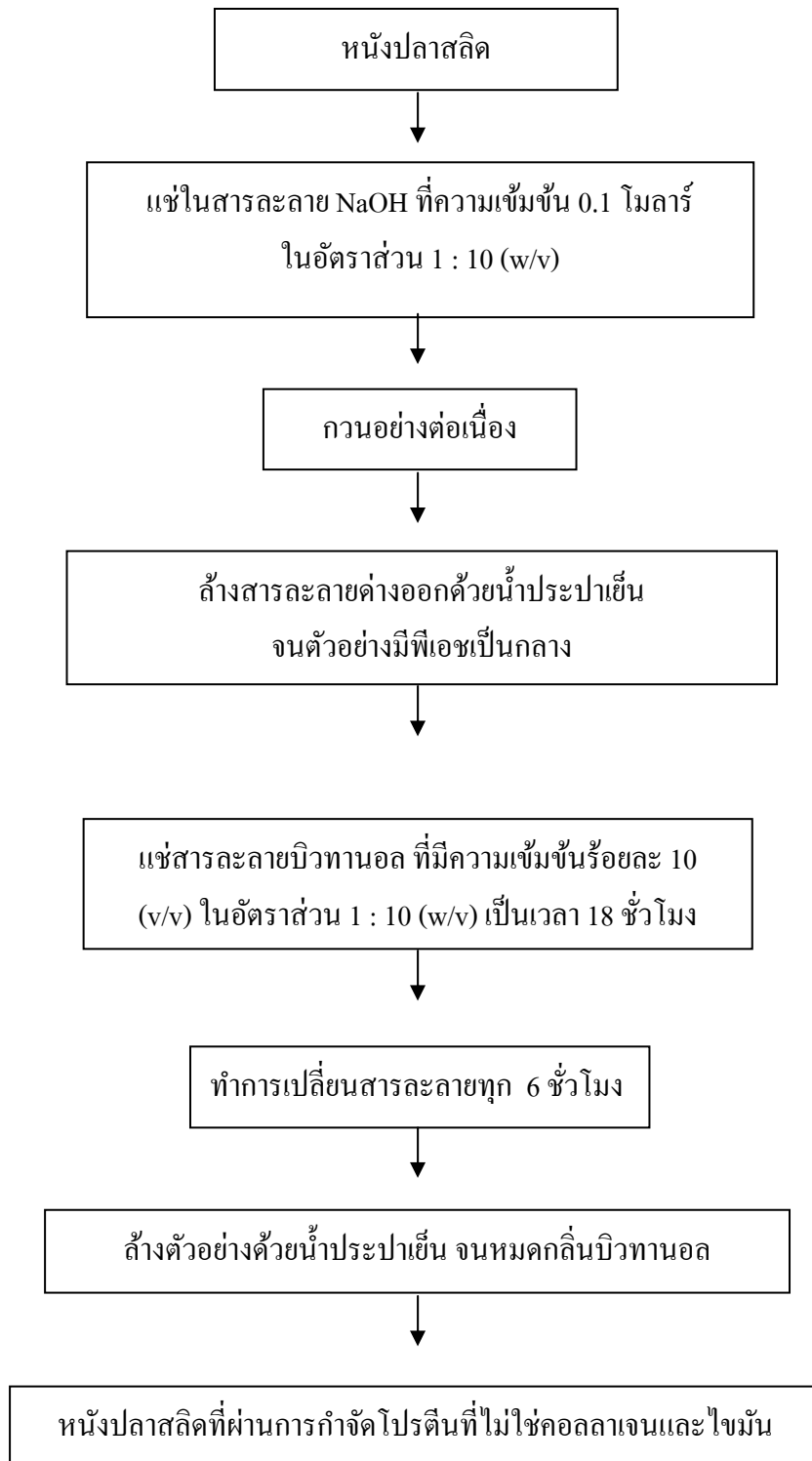
3.5.2.2 การสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสดทำได้โดยนำหนังปลาสดจากข้อ 3.5.2.1 มาสกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 15 (w/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น ส่วนของสารละลายที่ได้คือ สารละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (Acid solubilized collagen ; ASC) (ภาพที่ 3.2)

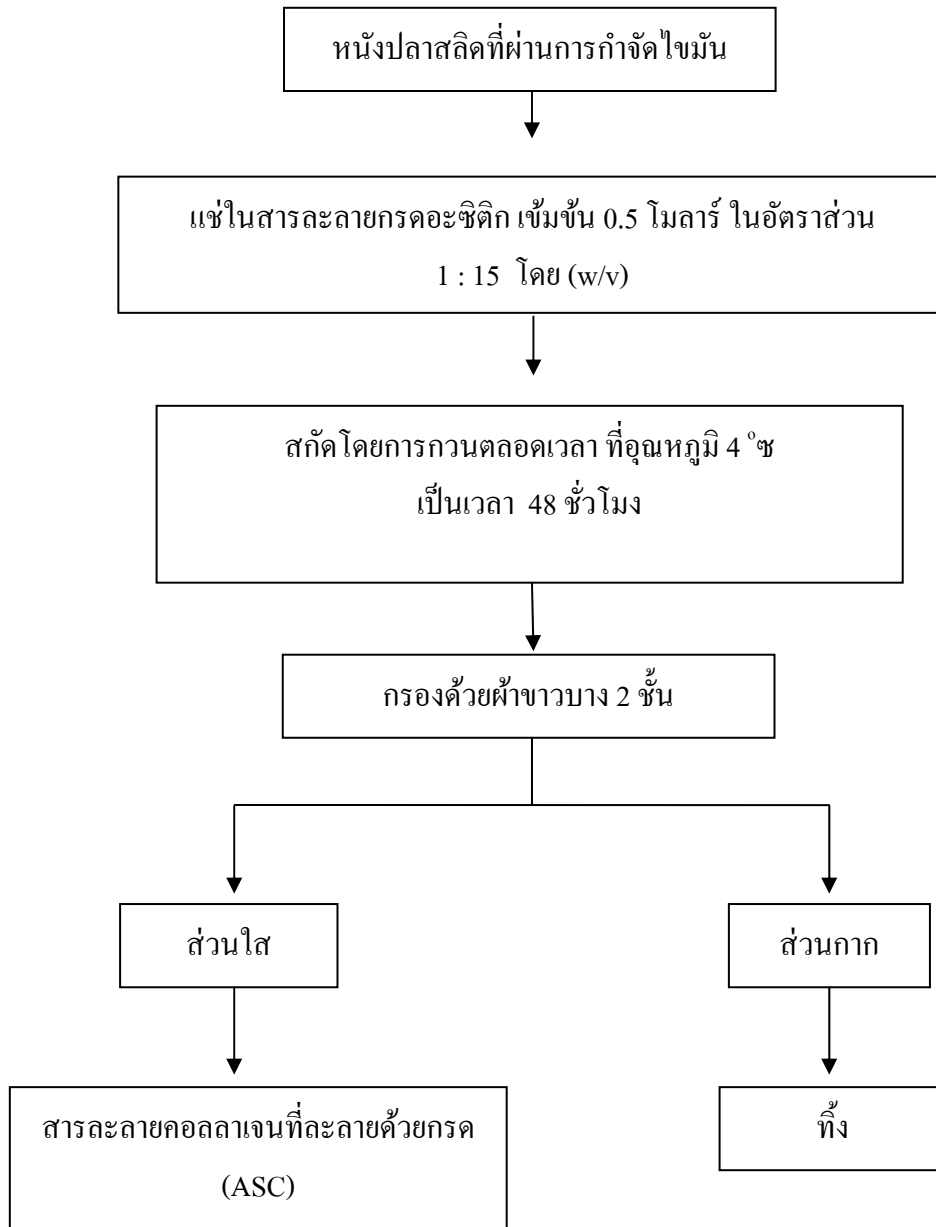
3.5.2.3 การตกตะกอนคอลลาเจน

นำ ASC ที่ได้จากข้อ 3.5.2.2 มาเติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.6 โมลาร์ ในสภาวะที่มี 0.05 โมลาร์ tris(hydroxymethyl) aminomethane ที่พีเอช 7.5 กวน

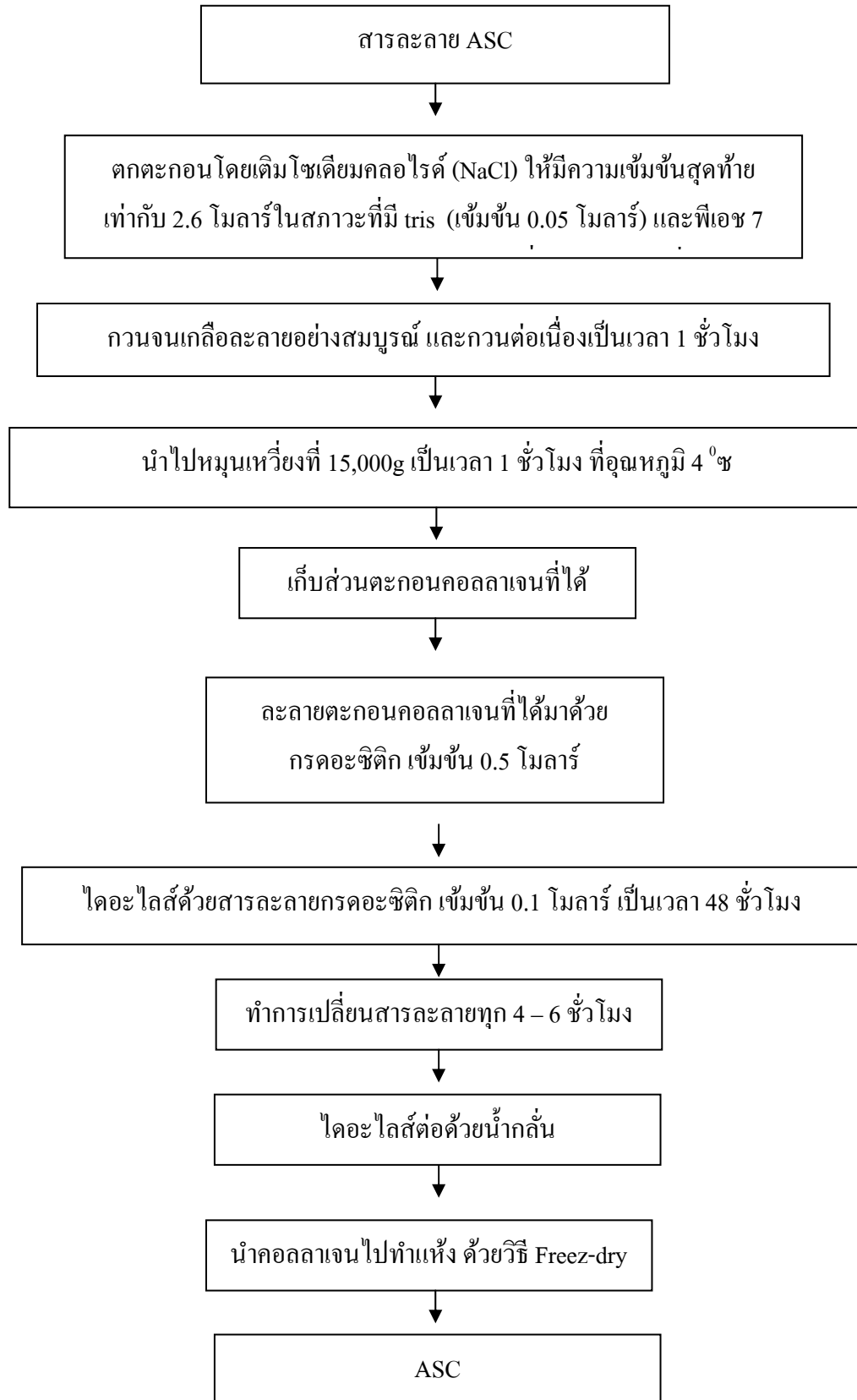
ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 15,000g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วทำการไดอะไลซ์ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนได้สารละลายใสแล้วไดอะไลซ์ต่อเนื่องด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายคอลลาเจนบริสุทธิ์ นำไปทำแห้งโดยการทำแห้งแบบระเหิด (freeze dry) จะได้คอลลาเจนแห้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์คุณลักษณะต่อไป ทั้งนี้ขั้นตอนโดยสรุปแสดงดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมหนังพลาสติก



ภาพที่ 3.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนด้วยกรด (ASC)



ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการตกตะกอนและไดอะไลส์และทำแห้งคอลลาเจนจากหนังพลาสติก

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิต องค์ประกอบทางเคมี และคุณลักษณะคอลลาเจน

3.5.3.1 ปริมาณผลผลิต

3.5.3.1.1 ปริมาณผลผลิตโดยน้ำหนักฐานเปียก

ร้อยละผลผลิต (ฐานเปียก) = [คอลลาเจน (g) / น้ำหนักพลาสติก (g)] x 100

3.5.3.1.2 ปริมาณผลผลิตโดยน้ำหนักฐานแห้ง

ร้อยละผลผลิต (ฐานแห้ง) = [คอลลาเจน (g) / น้ำหนักปลาแห้ง (g)] x 100

3.5.3.1.3 ปริมาณผลผลิตโดยฐานปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Hyp)

ร้อยละผลผลิต (Hyp) = [(ปริมาณ Hyp รวมของคอลลาเจนที่ได้) / (ปริมาณ Hyp รวมในตัวอย่างหนังปลาแห้ง)] x 100

3.5.3.2 คุณลักษณะและองค์ประกอบทางเคมี

3.5.3.2.1 การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่สกัดได้ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยละลายตัวอย่างด้วยสารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 5 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงแยกสารผสมที่ 4000g เป็นเวลานาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (แยกส่วนที่ไม่ละลายออก) แล้ว ผสมตัวอย่างที่ละลายได้ด้วยบัฟเฟอร์ (tris ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ที่มีพีเอช 6.8 ที่มี SDS ความเข้มข้นร้อยละ 4 และ กลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ในสถานะที่ไม่มีและมี β -ME ความเข้มข้นร้อยละ 10 จากนั้นต้มสารผสมในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที ที่ให้เย็น นำตัวอย่าง (15 ไมโครกรัมโปรตีน) ใส่ลงในเจลโพลีอะคริลามิด (polyacrylamide gels) ซึ่งประกอบด้วย running gel เข้มข้นร้อยละ 7.5 และ stacking gel เข้มข้นร้อยละ 4 ทำการแยกสายโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมแปร์/เจล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที โดยใช้เครื่อง Mini PROTEIN II เมื่อครบกำหนดเวลา แยกเจลออก แล้วย้อมสีเจลเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยสารละลายผสม Comasie blue R-250 ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในสารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 15 (v/v) และกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ (v/v) จากนั้นล้างสีย้อมออกด้วยสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 30 (v/v) และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 (v/v) ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนโดยใช้โปรตีนมาตรฐาน วิเคราะห์ปริมาณแถบโปรตีนที่แยกได้โดยใช้โปรแกรม ImageJ V.1.42q

3.5.3.2.2 การตรวจสอบการดูดกลืนแสงยูวี

นำตัวอย่างคอลลาเจนละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนได้ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นบันทึกค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สเปกโตรมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 300 นาโนเมตร

3.5.3.3 ตรวจสอบการละลายของคอลลาเจน

ทำการละลายคอลลาเจนในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนได้ความเข้มข้นของสารละลายคอลลาเจนสุดท้ายเท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมუნเหวียงที่ 5000g เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 °C

3.5.3.3.1 ผลของพีเอชต่อการละลาย

นำสารละลายคอลลาเจน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วทำการปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 นอร์มัล จนได้พีเอชสุดท้ายในช่วง 1-12 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการปรับพีเอช ที่ต้องการศึกษา นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวียงที่ 2000g เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 4 °C นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry โดยใช้ซีรัมอัลบูมินจากวัวเป็นโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาร้อยละของการละลายของคอลลาเจนในแต่ละพีเอช

3.5.3.3.2 ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อการละลาย

นำสารละลายคอลลาเจน (ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์จนได้ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0 1 2 3 4 5 และ 6 ทำการกวนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปหมუნเหวียงที่ 2000g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Lowry โดยใช้ซีรัมอัลบูมินจากวัวเป็นโปรตีนมาตรฐาน คำนวณหาร้อยละของการละลายของคอลลาเจนในแต่ละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

บทที่ 4

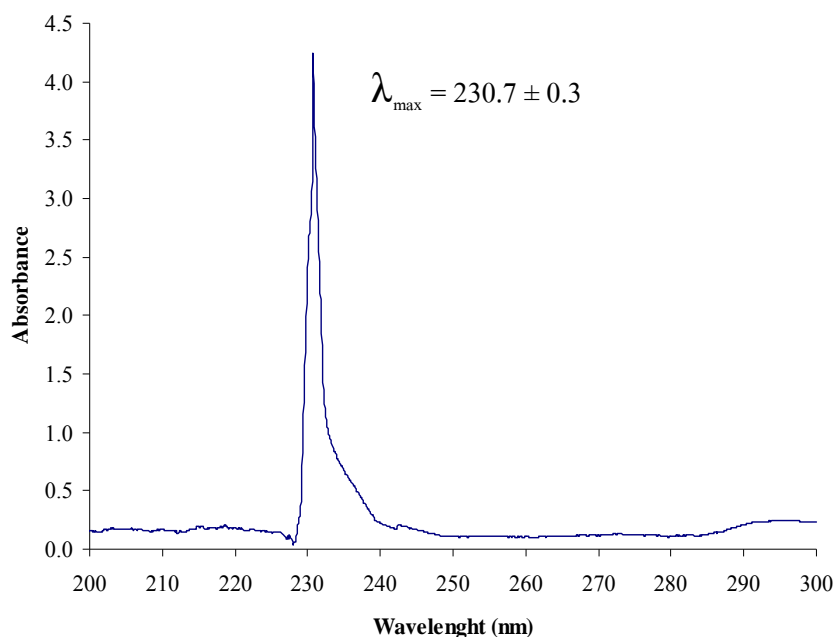
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณผลผลิตของคอลล่าเงินที่สกัดด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาสด

จากการทดลองสกัดคอลล่าเงินจากหนังปลาสดด้วยวิธีการใช้กรดพบว่า ได้ผลผลิต ASC เท่ากับร้อยละ 9.43 และ 34.65 โดยน้ำหนักฐานเปียกและฐานแห้ง ตามลำดับ ซึ่งการสกัด ASC จากหนังปลากระพงแดง และปลาฉลามกบโดยวิธีเดียวกันนี้ ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 9.0 (Jongjareonrak และคณะ, 2005) และ 9.38 (Kittiphattanabawon และคณะ, 2010) โดยน้ำหนักฐานเปียก ตามลำดับ โดย ASC จากหนังปลาสดและหนังปลาสดมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนเท่ากับ 23.2 ± 1.24 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และ 7.22 ± 0.6 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ASC มีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนสูงกว่าที่พบในหนังปลาสด เนื่องจากองค์ประกอบอื่นที่ไม่ใช่คอลล่าเงินถูกกำจัดออกจากหนังปลาสดในช่วงการเตรียมคอลล่าเงิน (Yata และคณะ, 2001) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nalinanon และคณะ (2011) ซึ่งพบว่าปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของ ASC จากหนังปลา ornate threadfin bream และหนังปลา ornate threadfin bream สดเท่ากับ 72.3 ± 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และ 49.5 ± 0.4 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง เมื่อคำนวณผลผลิตจากฐานของปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของ ASC จากหนังปลาสดพบว่า มีปริมาณผลผลิตเท่ากับร้อยละ 30.32 ซึ่งผลผลิตมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณผลผลิตคอลล่าเงินฐานแห้ง ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการสกัดที่ดี อย่างไรก็ตามข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าส่วนของหนังปลาวัดดูดิบที่เหลือจากการสกัดยังคงมีคอลล่าเงินหลงเหลืออยู่เป็นจำนวนประมาณร้อยละ 70 ดังนั้นเพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์วัตุดิบสูงสุดจึงควรมีการศึกษาเพื่อปรับปรุงการสกัดเพิ่มเติมให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

4.2 การดูกลืนแสงยูวีของคอลล่าเงินที่สกัดด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาสด

จากการทดลองพบว่า ASC จากหนังปลาสดดูกลืนแสงยูวีได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 230.7 ± 0.3 นาโนเมตร โดยโปรตีนทั่วไปที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน ไทโรซีน ทรีโพรเฟน และฟีนอลอะลาซีน ดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง 260-290 นาโนเมตร ซึ่ง ASC จากหนังปลาสดมีการดูกลืนแสงเล็กน้อยที่ความยาวคลื่นประมาณ 290 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่า ASC ไม่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนชนิดอื่น ดังนั้นสรุปได้ว่าขั้นตอนการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลล่าเงินมีประสิทธิภาพดี ซึ่งสอดคล้องกับคอลล่าเงินจากหนังปลา Walleye pollock และปลาฉลามกบที่สามารถดูกลืนแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 220-230 นาโนเมตร รวมทั้งมีการดูกลืนแสงเกิดขึ้นเล็กน้อยที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (Yan และคณะ, 2008 ; Kittiphattanabawon และคณะ, 2010)

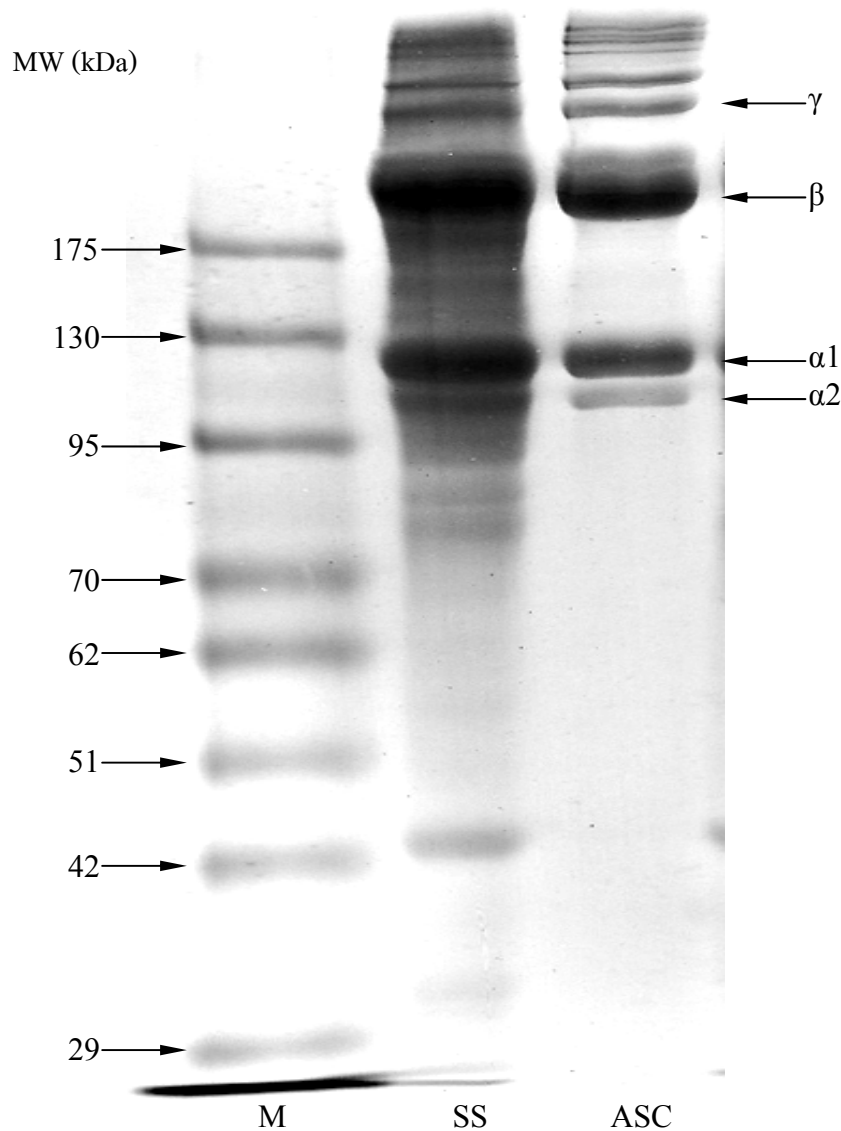


ภาพที่ 4.1 สเปกตรัมช่วงคลื่นแสงยูวี (UV-Spectrum) ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลา สลิด

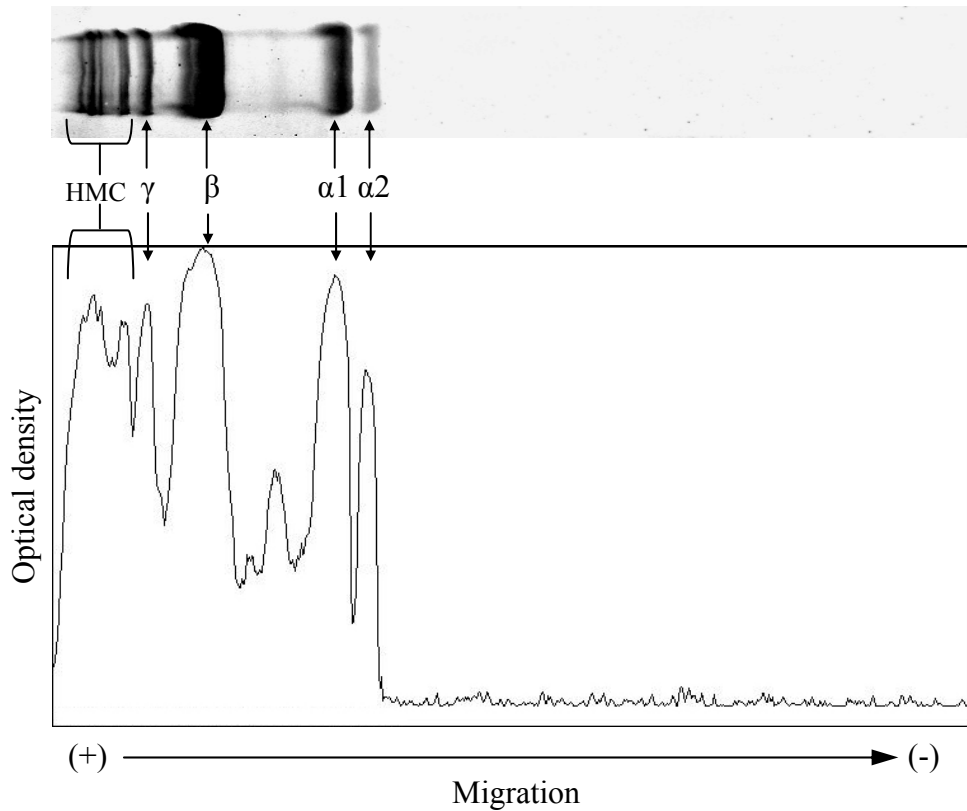
4.3 รูปแบบโปรตีนของหนังปลา สลิด และ ASC

เมื่อพิจารณารูปแบบโปรตีนของ ASC และหนังปลา สลิด ซึ่งแสดงดังรูปแบบที่ 4.2 พบว่ารูปแบบโปรตีนของหนังปลา สลิดประกอบด้วยโปรตีนหลากหลายชนิดกระจายตัวอยู่โดยเฉพาะโปรตีนโมเลกุลต่ำกว่า 95 กิโลดาลตัน ะปนอยู่ในปริมาณมาก ส่วน ASC จากหนังปลา สลิดที่สกัดได้ประกอบไปด้วยแถบ γ β α_1 และ α_2 โดยไม่พบแถบอื่นๆปะปนแสดงให้เห็นถึงความบริสุทธิ์ของคอลลาเจนที่สกัดได้ ASC มีองค์ประกอบ β ในปริมาณมากที่สุด รวมทั้งอัตราส่วน α_1 ต่อ α_2 คิดเป็นอัตราส่วนประมาณ 2:1 จึงสามารถจำแนก ASC จากหนังปลา สลิดในเบื้องต้นได้เป็นคอลลาเจนชนิด type I ในลักษณะเดียวกับคอลลาเจนจากหนังปลาโดยทั่วไป (Hwang และคณะ, 2007; Jongjareonrak และคณะ, 2005; Kittiphattanabawon และคณะ, 2005; Ogawa และคณะ, 2003) เมื่อพิจารณาความหนาแน่นของแถบ ASC จากหนังปลา สลิดโดยใช้แผนภาพภาพที่ 4.3 และตาราง 4.1 พบว่าส่วนขององค์ประกอบที่มีพันธะเชื่อมข้าม (องค์ประกอบ γ และ β) มีค่าสูง ซึ่งพบในลักษณะเช่นเดียวกับคอลลาเจนจากปลา Ornate threadfin bream (Nalinanon และคณะ, 2011) เมื่อคำนวณหาอัตราส่วนระหว่าง α_1 และ α_2 ของหนังปลา สลิด พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.37 ซึ่งใกล้เคียงกับสัดส่วน α_1 และ α_2 ที่พบในคอลลาเจนจากหนังปลา Ornate threadfin bream (2.18) และปลา Deep-sea redfish (2.47) ตามลำดับ (Nalinanon และคณะ, 2011; Wang และคณะ, 2007; Ogawa และคณะ, 2003) นอกจากนี้พบว่าอัตราส่วน $\beta/(\alpha_1 + \alpha_2)$ ของ ASC จากหนังปลา สลิดมีค่าเท่ากับ 1.18 ซึ่งต่ำกว่า ASC จาก

ปลา Ornate threadfin bream ปลา Deep-sea redfish และปลา Black drum ที่มีอัตราส่วน $\beta/(\alpha_1 + \alpha_2)$ เท่ากับ 1.39, 1.52 และ 1.59 ตามลำดับ (Nalinanon และคณะ, 2011; Wang และคณะ, 2007; Ogawa และคณะ, 2003) ซึ่งอัตราส่วน α_1/α_2 $\beta/(\alpha_1 + \alpha_2)$ $\gamma/(\alpha_1 + \alpha_2)$ และ $HMC/(\alpha_1 + \alpha_2)$ เป็นลักษณะเฉพาะที่พบในคอลลาเจนที่แตกต่างกันและบ่งบอกถึงสัดส่วนปริมาณของสายโมโนเมอร์และการเกิดพันธะเชื่อมข้ามของคอลลาเจน (Nalinanon และคณะ, 2011)



ภาพที่ 4.2 รูปแบบโปรตีนของหนังพลาสติก (SS) และคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังพลาสติก M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.3 แผนภาพความหนาแน่น (Densitogram) ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลา สลิด

ตารางที่ 4.1 อัตราส่วนความเข้มขององค์ประกอบต่างๆของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลา สลิด ปลา Ornate threadfin bream ปลา Deep-sea redfish ปลา Black drum และหนังลูกวัว

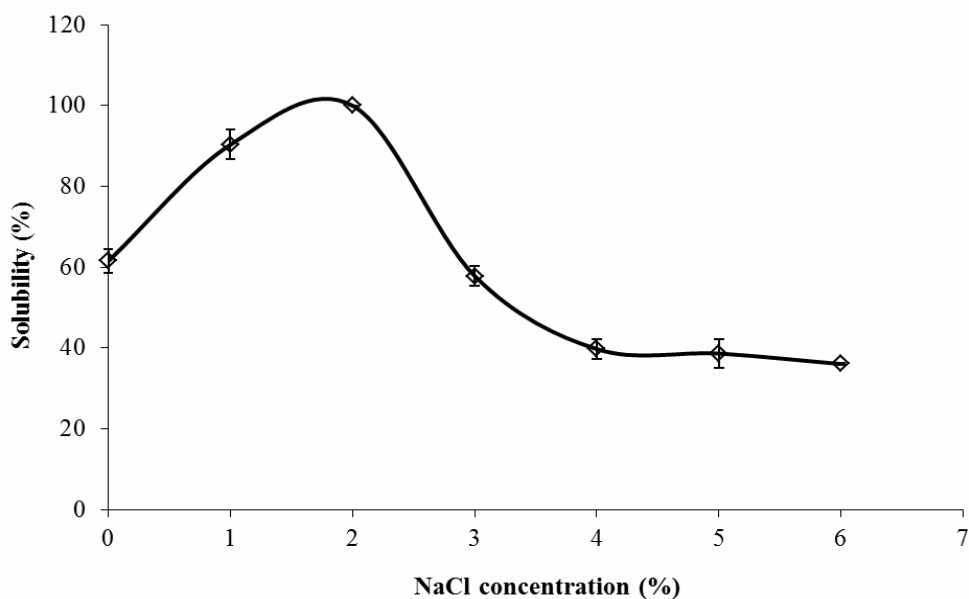
Components	Band intensity ratio				
	ASC	Ornate threadfin bream ^(a)	Deep-sea redfish ^(b)	Black drum ^(c)	Calf ^(c)
$\alpha 1/\alpha 2$	2.37	2.18	2.47	ND	ND
$\beta/(\alpha 1 + \alpha 2)$	1.18	1.39	1.52	1.59	1.26
$\gamma/(\alpha 1 + \alpha 2)$	0.45	0.33	1.1	1.32	0.75
HMC/ $(\alpha 1 + \alpha 2)$	1.15	0.62	ND	ND	ND

ND = Not determined.

ที่มา: (a) Nalinanon et al. (2011); (b) Wang et al. (2007) and (c) Ogawa et al. (2003).

4.4 ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อการละลายของ ASC

จากการทดลองนำ ASC จากหนังปลาสดมาทำการละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0 1 2 3 4 5 และ 6 ตามลำดับ พบว่า ASC สามารถละลายได้ดีในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 1-2 แสดงผลดังภาพที่ 4.4 ซึ่งผลสอดคล้องกับคอลลาเจนจากหนังปลาซวายที่สามารถละลายได้ดีในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0-2 (Singh และคณะ, 2011) การละลายของ ASC ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 4 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการละลายของ ASC ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ของคอลลาเจนจากหนังปลาตาหวาน และหนังปลากระพงแดง (Jongjareonrak และคณะ, 2005 ; Kittiphattanabawon และคณะ, 2005 ; Montero และคณะ, 1991) ซึ่งเป็นผลจากปรากฏการณ์ 'salting out' ของโปรตีนที่พบในความเข้มข้นเกลือสูง (Asghar และ Henrickson, 1982) ความแข็งแรงของไอออนเพิ่มขึ้นเป็นเหตุให้การละลายโปรตีนลดลงด้วยการเปลี่ยนแปลงของส่วนชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายโปรตีนและไอออนเกลือในน้ำที่เพิ่มขึ้น นำไปสู่การตกตะกอนโปรตีน (Vojdani, 1996) ซึ่งความแตกต่างในการละลายของคอลลาเจนในสารละลายเกลือเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบกรดอะมิโนและโครงสร้างของคอลลาเจนที่ต่างกัน จากการทดลองของ Kittiphattanabawon และคณะ (2005) พบว่า ASC จากก้างปลาตาหวานมีความทนต่อความเข้มข้นเกลือสูงกว่าหนังปลาตาหวาน ดังนั้นคอลลาเจนจากแหล่งที่มาต่างกันอาจมีสมบัติของโมเลกุลที่แตกต่างกัน

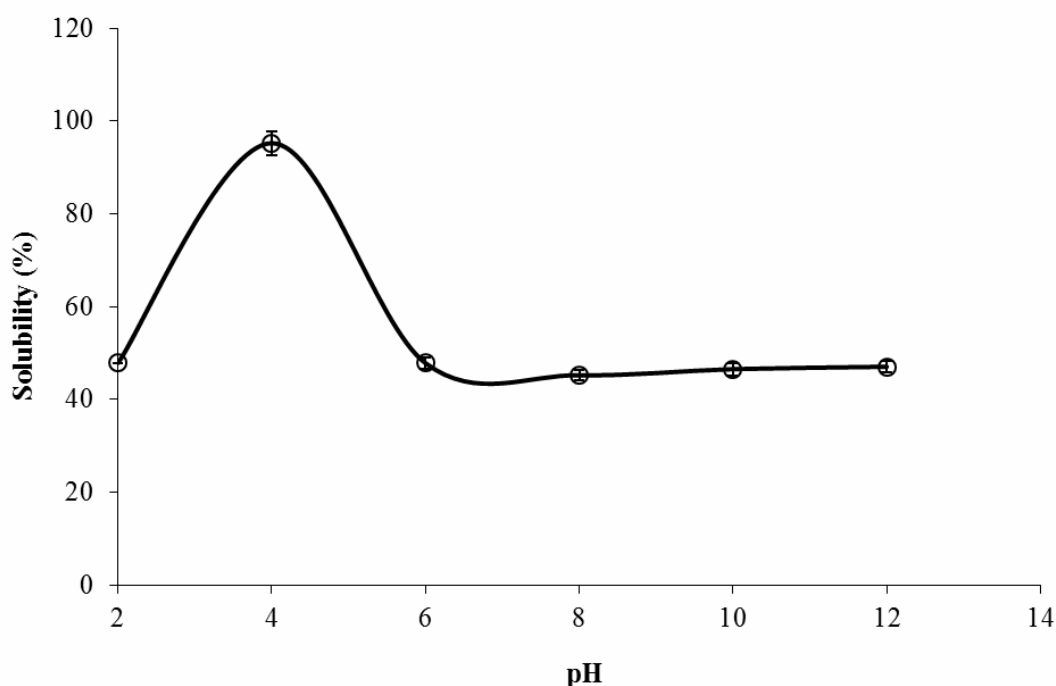


ภาพที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายเกลือต่อการละลายของ ASC

4.5 ผลของพีเอชต่อการละลายของ ASC

เมื่อนำคอลลาเจนจากหนังปลาสดมาทำการละลายในสารละลายที่มีสภาวะพีเอชเท่ากับ 2 4 6 8 10 และ 12 ตามลำดับ ได้ผลแสดงดังภาพที่ 4.5 ผลการทดลองพบว่าคอลลาเจนสามารถละลายได้ดีใน

สภาวะพีเอชเท่ากับ 2 จากนั้นความสามารถในการละลายของ ASC ลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่สภาวะพีเอชเท่ากับ 6 โดยผลการทดลองที่พบเป็นไปในลักษณะใกล้เคียงกับการละลายของคอลลาเจนจากหนังปลาชวยซึ่งพบละลายสูงสุดที่พีเอช 2 และละลายได้ดีที่สุดเมื่อพีเอชประมาณ 7 (Singh และคณะ, 2011) นอกจากนี้การละลายของคอลลาเจนจากกล้ามเนื้อและหนังปลาเทราท์ และคอลลาเจนจากหนังปลากระพงแดง Montero และคณะ (199) Jongiareonrak และคณะ (2005) ก็ให้ผลในลักษณะเดียวกันโดยทั่วไปคอลลาเจนละลายได้ดีในสารละลายกรดที่มีพีเอชประมาณ 1-4 พบว่าการละลายลดลงเมื่อช่วงพีเอชเป็นเป็นกลางและเบส โดยที่พีเอชต่ำกว่าหรือสูงกว่า pI ทำให้คอลลาเจนสามารถละลายได้ดีขึ้นด้วยแรงผลักระหว่างสาย (Vojdani, 1996) ในทางตรงกันข้ามเมื่อประจุสุทธิเป็นศูนย์ เกิดอันตรกิริยาระหว่างสายโปรตีนเพิ่มขึ้น นำมาสู่การตกตะกอนที่ pI โดยทั่วไปคอลลาเจนมี pI ในช่วงพีเอช 6 ถึง 9 (Foegeding และคณะ, 1996) นอกจากนี้ Kittiphattanabawon และคณะ (2005) อภิปรายไว้ว่าการที่ ASC จากหนังปลาตาหวานสามารถละลายได้ดีกว่า ASC จากก้างปลาตาหวานในสภาวะที่มีพีเอชมากกว่า 6 บ่งบอกถึงการมีระดับพันธะเชื่อมข้ามภายในคอลลาเจนต่ำ ซึ่งเป็นความแตกต่างของโมเลกุลภายในและการจัดเรียงรูปแบบกรดอะมิโนของคอลลาเจน



ภาพที่ 4.5 ผลพีเอชต่อการละลายของ ASC

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดลองการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสดด้วยกรดอะซิติก ทำให้ได้คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) ที่มีปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 34.65 โดยน้ำหนักฐานแห้ง โดยพบปริมาณไฮดรอกซีโอรลีนเท่ากับ 23.22 ± 1.24 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ASC ประกอบด้วยสาย β และ α เป็นองค์ประกอบหลัก และสามารถจำแนกชนิดเบื้องต้นได้เป็นคอลลาเจน Type I สารละลาย ASC สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้สูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 230.7 ± 0.3 นาโนเมตร ASC ละลายได้ดีในช่วงที่พีเอช 4 และสารละลายที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 2

5.2 -ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสมบัติทางเคมีกายภาพ และการแปรสภาพคอลลาเจนให้มีสมบัติทางชีวเคมีที่เป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรม และด้านอาหาร ซึ่งจะเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ปลาสด

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

6.1 ผลงานนำเสนอในการประชุมวิชาการนานาชาติ (ภาคผนวก ง)

- **Nalinanon, S., Benjakul, S. and Kishimura, H.** 2013. Characterization of acid solubilized collagen from the skin of Siamese gourami (*Trichogaster pectoralis*). EUROFOODCHEM XVII, Istanbul, Turkey, 7th-10th May. Poster presentation.

บรรณานุกรม

- กรมประมง. 2554. ปลาสลิด. เข้าถึงได้จาก: <http://www.fisheries.go.th/if-suratthani/1plasalid.htm> (3 เมษายน 2555)
- ทวีเม. 2008. [ออนไลน์]. คอลลาเจน. บริษัท จาร์พา เทคโนโลยี จำกัด. เข้าถึงได้จาก: <http://www.charpa.co.th/articles/collagen.asp> (2 สิงหาคม 2554)
- วิกิพีเดีย. 2555. ปลาสลิด. เข้าถึงได้จาก: <http://th.wikipedia.org/wiki/ปลาสลิด> (25 เมษายน พ.ศ.2555)
- Ally, M and Rachel, G. 2011. collagen. เข้าใจได้จาก: <https://chempolymerproject.wikispaces.com/Collagen++B+rgam> (Accessed August, 14 2011)
- Beck, K. and Brodsky, J. 1998. Supercoiled protein motifs: The collagen triple-helix and the α -helical coiled coil. *Journal of Structural Biology*. 122: 17–29.
- Cao, H. and Xu, S.-Y. 2008. Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage. *Food Chemistry*. 108: 439–445
- Foegeding, E., Lanier, T.C. and Hultin, H.O. (1996). Characteristics of edible muscle tissue (3rd ed.. In O. R. Fennema (Ed.). *Food chemistry*. 879–942. New York: Marcel Dekker.
- Gelse K., Poschl, E. and Aigner, T. 2003. Collagens-structure function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 1531–1546.
- Helen E., and Cahir A. 2005. Spatial organization of type I and II collagen in the canine meniscus. *Journal of Orthopaedic Research*. 23: 142–149.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D. and Mann, S. 2003. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 32: 199–204.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*. 93: 475–484.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 89: 363–372
- Lowry, Q.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A. and Randall, R.J. 1957. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 256-275.

- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Osako, K. 2011. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry*. 125: 500–507.
- Nalinanon, S., Benjakul, S. and Kishimura, H. 2011. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry*. 125: 500-507.
- Ogawa, M., Moody, M.W., Portier, R.J., Bell, J., Schexnayder, M.A. and Losso, J.N. 2003. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *J. Agric. Food Chemistry*. 51: 8088–8092.
- Pieper, J. S. and Van der Kraan, P. M. 2002. Crosslinked type II collagen atrices: preparation characterization and potential for cartilage engineering. *Biomaterials*. 23, 3183–3192.
- Shen, X. R., Kurihara, H., and Takahashi, K. 2007. Characterisation of molecular species of collagen in scallop mantle. *Food Chemistry*. 102: 1187–1191.
- Singh, P., Benjakul S., Maqsood S., Kishimura, H. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*. 124: 97–105
- Swatschek, D., Schatton, W., Kellermann, J., Muller, W. E. G. and Kreuter, J. 2002. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 53: 107–113.
- Vojdani, F. 1996. Solubility. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality*. Great Britain: St. Edmundsbury pp. 11–60.
- Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L. and Hu, Q. 2007. Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Journal of Food Science*. 72:E450–E455.
- Wikipedia. 2010. Collagen. เข้าถึงได้จาก: <http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen>. (Accessed January, 09 2011)
- Yan, M., Li, B., Zhao, X., Ren, G., Zhuang, Y., Hou, H., Zhang, X., Chen, L. and Fan, Y. 2008. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) *Food Chemistry*. 107: 1581–1586.
- Zhang, M., Liu, W., and Li, G. 2009. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chemistry*. 115: 826–831.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตรวจสอบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Nalananon และคณะ, 2010)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายออกซิเดชัน (oxidant solution)

(a) สารละลายคอลลาซีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียมก่อนใช้)

(b) เตรียม acetate/ citrate buffer pH 6.0 โดยละลาย Sodium acetate•(3H₂O) ปริมาณ 57 กรัม tri-sodiumcitrate•(2H₂O) ปริมาณ 37.5 กรัม acetic acid ปริมาณ 5.5 กรัม และ iso-propanol ปริมาตร 385 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันด้วยน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายออกซิเดชันโดยใช้สารละลาย a 1 ส่วน ต่อ สารละลาย b 4 ส่วน โดยเตรียมก่อนการวิเคราะห์

1.2 สารละลายเออร์ริช (Ehrlich's reagent)

(a) ละลาย p-Dimethylamine-benzaldehyde ด้วย perchloric acid ความเข้มข้นร้อยละ 60 โดยปริมาตร ในอัตราส่วน 2 ต่อ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา

(b) สารละลาย iso-propanol

เตรียมสารละลายเออร์ริช โดยใช้สารละลาย a 3 ส่วน ต่อ สารละลาย b 13 ส่วน โดยเตรียมก่อนการวิเคราะห์

2. การเตรียมตัวอย่าง

2.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง โดยตัวอย่างสดชั่งน้ำหนักให้ได้ 0.5-1.0 กรัม ตัวอย่างเจลาตินผง ชั่งน้ำหนักให้ได้ 0.1 กรัม นำตัวอย่างมาทำการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2 นำตัวอย่างที่เติมกรดไฮโดรคลอริกแล้วมาทำการย่อยโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำมันเป็ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 เมื่อครบระยะเวลา ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วใส่ผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer

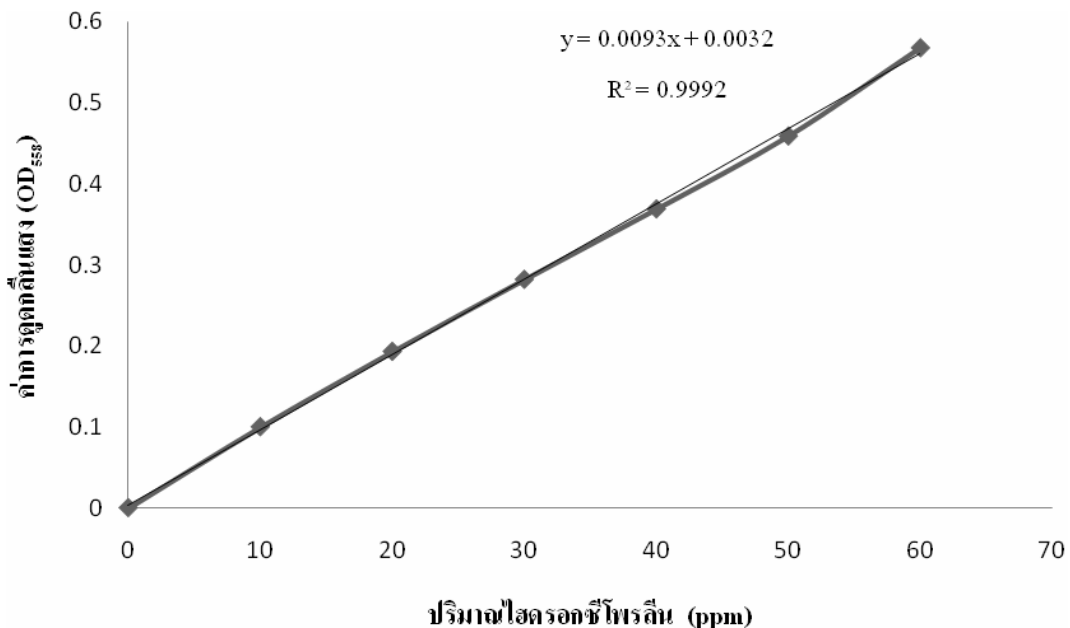
2.4 กรองด้วยกระดาษกรอง What man No.4 ใส่ใน flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับให้เป็นกลาง (พีเอช 6.0-6.5) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 โมลาร์

2.5 นำมาปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ในขวดปรับปริมาตร

3. การวิเคราะห์

- 3.1 ปิเปตตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมมาตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวเติมสารละลาย iso-propanol ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer
- 3.2 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.1 มาเติมสารละลายออกซิเดชัน 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที
- 3.3 เมื่อครบระยะเวลา เติมสารละลาย Ehrlich ทันที แล้วผสมให้เข้ากัน
- 3.4 นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยใช้น้ำประปาไหลผ่านด้านข้างหลอดทดลองเป็นเวลา 2-3 นาที
- 3.5 นำมาเจือจางด้วยสารละลาย iso-propanol ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร
- 3.6 นำสารละลายที่ได้ข้างต้นมาทำการวัดค่าดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร
- 3.7 ทำ blank ตามข้อ 3.1-3.5 โดยเปลี่ยนจากตัวอย่างเป็นน้ำกลั่นแทน
- 3.8 นำค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน จากสมการ

กราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

ภาคผนวก ข

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

1. วิธีเตรียมสารเคมี

1.1 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตในด่าง

เตรียมโดยละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

1.2 สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต – โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต

เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายต่าง

ผสมสารข้อ 1.1.1 ปริมาณ 50 ส่วนโดยปริมาตร กับสารละลายในข้อ 1.1.2 ปริมาณ 1 ส่วนโดยปริมาตร (ผสมก่อนใช้)

1.4 Folin

เจือจางสารละลายจากขวดสำเร็จด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (จาก 2 นอร์มัล เป็น 1 นอร์มัล) สารละลายนี้เป็นสารละลายของโซเดียมทั้งสเตตและโซเดียมโมลิบเดต ในกรดฟอสฟอริกและไฮโดรคลอริก

1.5 สารละลายมาตรฐาน BSA

ละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) 0.0125 กรัม ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

2.1.1 เตรียมหลอดทดลอง 6 หลอด ปิเปิดสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมได้ ปริมาตร 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank (ทำ 3 ซ้ำ)

2.1.2 เติมน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 1 มิลลิลิตร จะได้ปริมาณโปรตีนแต่ละหลอดเป็น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัม ตามลำดับ

2.1.3 เติมสารละลายต่างหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

2.1.4 เติมสารละลายFolinหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ในขณะที่เติมให้เขย่าหลอดด้วยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

2.1.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD_{750}) กับปริมาณ โปรตีน (ไมโครกรัม) ในแต่ละหลอดโดยใช้ค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ซ้ำ

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

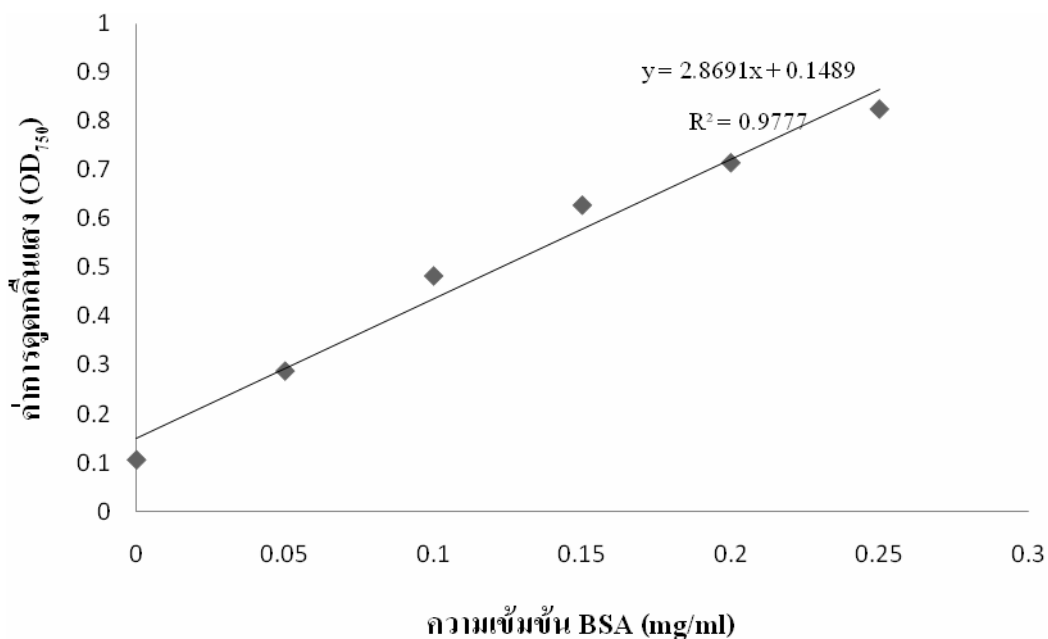
2.2.1 เจือจางตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.2.2 ปิเปตตัวอย่างเจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

2.2.3 เติมสารละลายต่างหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

2.2.4 เติมFolinหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ในขณะที่เติมให้เขย่าหลอดด้วยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

2.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณ โปรตีนในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐานของ BSA



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ BSA

ภาคผนวก ก

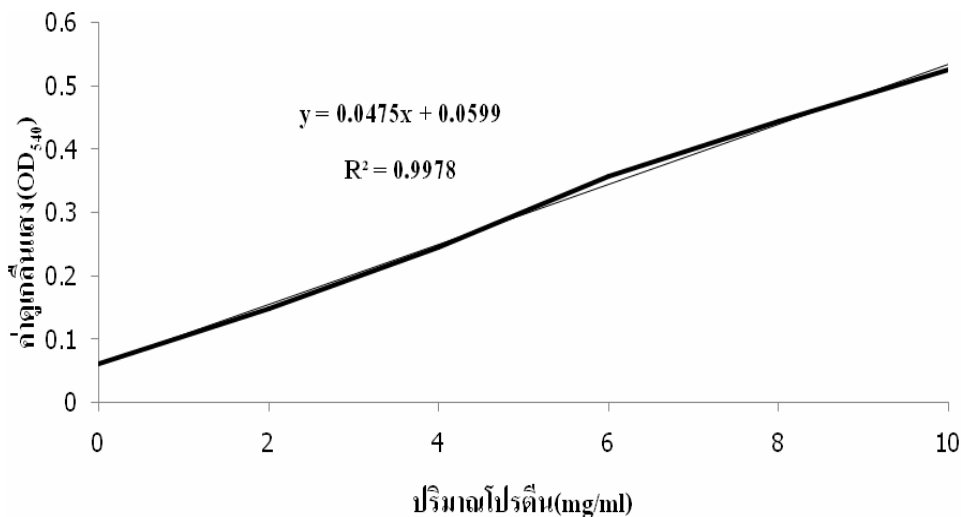
การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret (Copeland และคณะ, 1994)

1. วิธีเตรียมสารละลายไบยูเรต

ผสมคอปเปอร์ซัลเฟต 1.5 กรัม ให้เข้ากับโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต 6 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แล้วคนให้เข้ากัน ขณะคนเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ 1 กรัม จากนั้นย้ายใส่ขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วเก็บในขวดพลาสติกทึบแสง

2. วิธีวิเคราะห์

- 2.1 ปิเปตตัวอย่างที่มีความเข้มข้น โปรตีนประมาณ 1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง
- 2.2 เติมน้ำไบยูเรต รีเอเจนท์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นผสมด้วย Vortexmixer
- 2.3 ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง ประมาณ 30-45 นาที
- 2.4 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง โดยใช้กราฟมาตรฐานของ BSA



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณ โปรตีน

ภาคผนวก ง
รายละเอียดผลงานวิจัยที่ผลิตได้

Other Food Chemistry Related Topics

CHARACTERIZATION OF ACID SOLUBILIZED COLLAGEN FROM THE SKIN OF SIAMESE GOURAMI (*Trichogaster pectoralis*)

Sitthipong Nalinanon¹, Soottawat Benjakul² and Hideki Kishimura³

¹ Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand (Email: knsitthi@kmitl.ac.th)

² Department of Food Technology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

³ Laboratory of Marine Products and Food Science, Research Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

The objective of this study was to characterize the acid solubilized collagen (ASC) from the skin of Siamese 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. Then, ASC was subjected to partial purify using TOYOPEARL® CM-650M column chromatography. The yield of ASC was 9.43% and 34.65%, based on wet weight and dry weight of the skin used, respectively. 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.

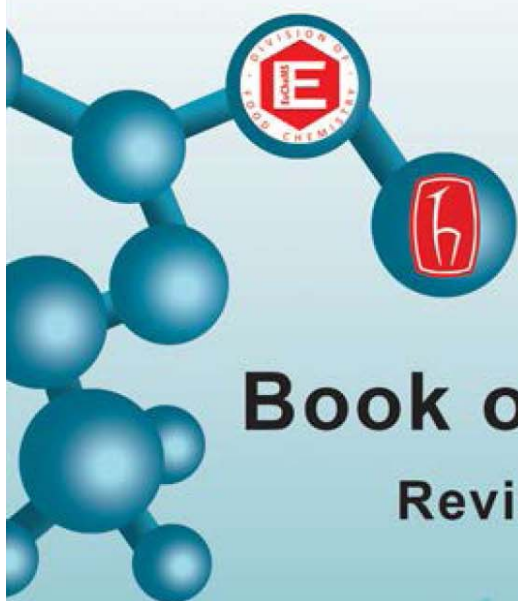
Keywords: Characterization, Collagen, *Trichogaster pectoralis*, Skin

References

- Nalinanon, S., Benjakul, S. and Kishimura, H. 2011. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. Food Chem. 125(2): 500-507.
- Ogawa, M., Moody, M.W., Portier, R.J., Bell, J., Schexnayder, M.A., Losso, J.N. 2003. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. J. Agric. Food Chem. 51(27): 8088–8092.
- Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L., Hu, Q. 2007. Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). J. Food Sci. 72(8):E450–E455.

EUROFOODCHEM XVII

May 07-10, 2013 Istanbul, TURKEY



Book of Abstracts

Revised Edition

EDITED BY
Hamit KÖKSEL

www.eurofoodchemxvii.org

COMMITTEES

Honorary Committee

Dr Mehmet Mehdi EKER
Minister, Ministry of Food, Agriculture and Livestock

Dr A. Murat TUNCER
Rector, Hacettepe University

Organising Committee

Chair

Dr Hamit KÖKSEL
(National Delegate, EuCheMS Food Chem. Div.) Hacettepe University, Turkey

Members

Dr Arzu BAŞMAN
Hacettepe University, Turkey

Dr Roger FENWICK (Former President, EuCheMS Food Chem. Div.)
Institute of Food Research, UK

Dr Michael MURKOVIC (Secretary, EuCheMS Food Chem. Div.)
Graz University of Technology, Austria

Dr Livia Simon SARKADI (President EuCheMS, Food Chem. Div.)
Corvinus University of Budapest, Hungary

Dr Ümran UYGUN
Hacettepe University, Turkey

Scientific Committee

Dr Cesarettin ALAŞALVAR, Turkey
Dr Susan ARNTFIELD, Canada
Dr Nevzat ARTIK, Turkey
Dr H. Tanju BESLER, Turkey
Dr Dilek BOYACIOĞLU, Turkey
Dr Srinivasan DAMODARAN, USA
Dr İrfan EROL, Turkey
Dr Vincenzo FOGLIANO, Italy
Dr Juana FRIAS, Spain
Dr Fahrettin GÖĞÜŞ, Turkey
Dr Vural GÖKMEN, Turkey
Dr Thomas GUDE, Switzerland
Dr Gürbüz GÜNEŞ, Turkey
Dr Mehmet HAYTA, Turkey
Dr Thomas HENLE, Germany

Dr Muammer KAPLAN, Turkey
Dr Mükerrerem KAYA, Turkey
Dr Amos NUSSINOVITCH, Israel
Dr Semih ÖTLEŞ, Turkey
Dr Nihat PAKDİL, Turkey
Dr Mariusz PISKULA, Poland
Dr Roland E. POMS, Austria
Dr Bert POPPING, Germany
Dr Livia Simon SARKADI, Hungary
Dr Fereidoon SHAHIDI, Canada
Dr Carmen SOCACIU, Romania
Dr Hans STEINHART, Germany
Dr Berrin ŞENÖZ, Turkey
Dr Rimantas VENSKUTONIS, Lithuania
Dr Angelo VISCONTI, Italy

<i>Abolfazl kamkar, Behroz jannat, PeimanQagharbeigi, AshrafHaj Hosseini Babaei</i>	
COMPARATIVE STUDY ON LIPID AND FATTY ACID COMPOSITION IN MUSCLE, HEAD AND SKIN OF WILD AND FARMED FISH ARGYRO SOMUS REGIUS <i>Vassilia J. Sinanoglou, Margarita-Adigoni Poulou, Charalampos Proestos, Sofia Miniadis-Meimaroglou</i>	684
LIPID PROFILE EXAMINATION OF GAMMA IRRADIATED MACADAMIA NUTS IN RELATION TO PACKAGING AND STORAGE CONDITIONS <i>Vassilia J. Sinanoglou, Panagiotis Zoumpoulakis, Irimi F. Strati, Charalampos Proestos, Spyridon E. Papadakis, Konstantinos Sflomos</i>	685
EFFECTS OF SEVERAL DRYING METHODS ON GLUTATHIONE CONCENTRATION OF TOMATO <i>Özlem AKTÜRK, Omca DEMİRKOL</i>	686
EVOLUTION OF CHEMICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS DURING FONTINA PDO CHEESE RIPENING <i>A. Sado, L. Thedy, S. Valentini, H. Lale Murix, A. Barmaz</i>	687
PHENOLIC COMPOUNDS ANALYSIS OF ULTRASOUND AND CLASSIC EXTRACTIONS OF CAROB <i>V. Hazal ÖZYURT, Semih ÖTLEŞ</i>	688
TOTAL PHENOLIC CONTENT, FLAVONOID CONCENTRATION AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF SALVIA RINGENS SIBTH. & SM. EXTRACTS <i>Ana Alimpić, Sonja Duletić-Laušević, Petar D. Marin, Ksenija Mileski, Vlado Matevski</i> ..	689
CHARACTERIZATION OF ACID SOLUBILIZED COLLAGEN FROM THE SKIN OF SIAMESE GOURAMI (<i>Trichogaster pectoralis</i>) <i>Sithipong Nalinanon, Soottawat Benjakul, Hideki Kishimura</i>	690
PHENOLICS COMPOSITION OF A NATURALLY DEBITTERED OLIVE <i>A.Burcu Aktas, İlknur Sen, Banu Ozen, Figen Tokatli</i>	691
COWPEA VIGNIN EXERTS HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECT BY REGULATION OF HEPATIC GENES IN RATS FED A HIGH-CHOLESTEROL DIET <i>Ederlan de Souza Ferreira, Daniella de Barros Rossetto, Aureluce Demonte, Cleslei Fernando Zanelli, Valdir Augusto Neves</i>	692
β -CONGLYCININ REGULATES GENE EXPRESSION INVOLVED IN CHOLESTEROL AND TRIACYLGLYCEROL METABOLISM IN RATS <i>Ederlan de Souza Ferreira, Daniella de Barros Rossetto, Aureluce Demonte, Luis Carlos Spolidori, Cleslei Fernando Zanelli, Valdir Augusto Neves</i>	693
EFFECT OF STORAGE ON CHEMICAL PROPERTIES OF HONEY <i>Elif Yorulmaz Önder, Asli Elif Sunay, İlknur Coşkun, İlknur Temli, Özlem Cengiz</i>	694
INFLUENCE OF ACTIVE PACKAGING MATERIALS ON MICROORGANISMS OF SELECTED FOOD STUFFS <i>Clemens Fleischberger, Vasiliki-Maria Archodoulaki, Ingrid Steiner</i>	695
FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROMETRIC ANALYSIS OF STRUCTURAL CHANGES OF MUSHROOM POLYPHENOL OXIDASE DURING INACTIVATION BY THERMOSONICATION <i>Hande Baltacıoğlu, Alev Bayındırılı, Feride Severcan</i>	696
WATERMELON (<i>Citrullus lanatus</i>) JUICE NANOFILTRATION AND IMPACT ON ITS SUGAR CONTENT <i>Nathalia D. A. Arriola, Gielen D. Santos, Carmen L. O. Petkowicz,Elane S. Prudêncio, Renata D. M. C. Amboni</i>	697
STUDY ON THE INTERACTION SITE OF β -LACTOGLOBULIN DIMER AND ELECTROPHILIC MOLECULES <i>Elizabeth Del Moral-Ramírez,, Lenin Domínguez-Ramírez , Mariano García-Garibay,</i>	698

ภาคผนวก จ
สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย

1. รายละเอียดงบประมาณที่เสนอขอ

รายละเอียดงบประมาณที่เสนอขอ

1. ค่าใช้สอย	30,000 บาท
2. ค่าวัสดุ	68,000 บาท
3. ค่าสาธารณูปโภค	<u>2,000 บาท</u>
รวม	<u>100,000 บาท</u>

2. แผนการใช้จ่ายเงิน

รายการ	วงเงินที่ใช้แต่ละเดือน											
	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
ค่าใช้สอย			5,000	5,000		5,000	5,000		5,000	5,000		
ค่าวัสดุ		5,000	5,000	5,000	10,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	4,000	4,000
ค่าสาธารณูปโภค					1,000				1,000			

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายสิทธิพงษ์ นลินานนท์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Sitthipong Nalinanon

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ และผู้ช่วยคณบดี คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัติการศึกษา

ระดับ	สถานศึกษา	ประเทศ	ปีที่ยจบ	วุฒิการศึกษา
ปริญญาตรี	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	ไทย	2545	วท.บ. (เทคโนโลยีอาหาร)
ปริญญาโท	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ไทย	2549	วท.ม. (เทคโนโลยีอาหาร)
ปริญญาเอก	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ไทย	2553	ปร.ด. (เทคโนโลยีอาหาร)

ทุนวิจัยที่กำลังดำเนินการ และที่เคยได้รับ

Projects	Year	Granting agency	Status	
Preparation and characterization of collagens and collagen hydrolysates from the skin of splendid squid and Pharaoh cuttlefish	2013	The Thailand Research Fund	Principal investigator	O
Purification and characterization of acid solubilized collagen from the skin of snakeskin gourami (<i>Trichogaster pectoralis</i>)	2013	Thailand Toray Science Foundation	Principal investigator	O
Characterization of acid solubilized collagen from the skin of snakeskin gourami (<i>Trichogaster pectoralis</i>)	2013	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang	Principal investigator	O
Quality improvement of fishery products and the maximized uses of fish processing by-products: Phase 2	2012-2014	The Thailand Research Fund	Co-investigator	O
Extraction and characterization of collagen from the inner-lining tissue of chicken gizzard	2012	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang	Principal investigator	O
Study of <i>Acacia mangium</i> Leaves Utilization for Feedstuff in Broiler Chickens	2012-2013	National Research Council of Thailand	Co-investigator	O
Isolation and characterization of collagen from the skin of splendid squid (<i>Loligo formosana</i>) and	2012	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang	Principal investigator	O

pharaoh cuttlefish (<i>Sepia pharaonis</i>)				
Purification, partitioning and uses of fish pepsin for collagen extraction and protein hydrolysate production	2007-2010	Prince of Songkla University	Principal investigator	D
Uses of pepsin for collagen and gelatin extraction from bigeye snapper (<i>Priacanthus tayenus</i>) skin	2004-2006	Prince of Songkla University	Principal investigator	D

D: done; O: on-going

ผลงานทางวิชาการและงานวิจัย

Book Chapter

Benjakul, S., **Nalinanon, S.** and Shahidi, F. 2012. Fish collagen. *In* Food biochemistry and food processing. 2nd Ed. (Simpson, B.K., Nollet, L.M.L., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G. and Hui, Y.H. eds.). pp. 646-675. John Wiley & Sons, Inc. USA.

International Peer Reviewed Papers

- Kaewruang, P., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B., and **Nalinanon, S.** 2014. Impact of divalent salts and bovine gelatin on gel properties of phosphorylated gelatin from the skin of unicorn leatherjacket. *LWT - Food Science and Technology*. 55: 477–482. (Impact factor 2012 = 2.546)
- Kaewruang, P., Benjakul, S., Prodpran, T., **Nalinanon, S.** 2013. Physicochemical and functional properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as affected by extraction conditions. *Food Bioscience*. 2: 1-9.
- Sae-Leaw, T., Benjakul, S., Gokoglu, N., **Nalinanon, S.** 2013. Changes in lipids and fishy odour development in skin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored in ice. *Food Chem*. 141: 2466-2472. (Impact factor 2012 = 3.334)
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., **Nalinanon, S.** and Kristinsson, H.G. 2012. Lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysate from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle as affected by freshness and antioxidants. *Food Chem*. 132: 1781-1788. (Impact factor 2012 = 3.334)
- Kanno, G., Kishimura, H., Yamamoto, J., Ando, S., Shimizu, T., Benjakul, S., Klomklao, S., **Nalinanon, S.**, Chun, B.-S. and Saeki, H. 2011. Cold-adapted structural properties of trypsins from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) and Arctic cod (*Boreogadus saida*). *Eur. Food Res. Technol*. 233: 963-972. (Impact factor 2012 = 1.436)

- Fuchise, T., Sekizaki, H., Kishimura, H., Klomklao, S., **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Chun, B.-S. 2011. Simple Preparation of Pacific Cod Trypsin for Enzymatic Peptide Synthesis. *J. Amino Acids*. vol. 2011, Article ID 912382, 8 pages, 2011. doi: 10.4061/2011/912382
- Chun, B.-S., Kishimura, H., **Nalinanon, S.**, Klomklao, S. and Benjakul, S. 2011. Mackerel trypsin purified from defatted viscera by supercritical carbon dioxide. *J. Amino Acids*, vol. 2011, Article ID 728082, 7 pages, 2011. doi:10.4061/2011/728082
- Kanno, G., Kishimura, H., Ando, S., Klomklao, S., **Nalinanon, S.**, Benjakul, S., Chun, B.-S. and Saeki, H. 2011. Structural properties of trypsin from cold-adapted fish, arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*). *Eur. Food Res. Technol.* 232: 381-388. (Impact factor 2012 = 1.436)
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Kishimura, H. 2011. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chem.* 125: 500-507. (Impact factor 2012 = 3.334)
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Kishimura, H. 2011. Functionalities and antioxidative properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem.* 124: 1354-1362. (Impact factor 2012 = 3.334)
- Kishimura, H., Nagai, Y., Fukumorita, K., Adachi, K., Chiba, S., Nakajima, S., Saeki, H., Klomklao, S., **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Chun, B.-S. 2010. Acid- and heat-stable trypsin inhibitory peptide from the viscera of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*). *J. Food Biochem.* 34: 748-763. (Impact factor 2012 = 0.76)
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Kishimura, H. 2010. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) stomach. *J. Sci. Food Agric.* 90: 1492-1500. (Impact factor 2012 = 1.759)
- Ahmad, M., Benjakul, S. and **Nalinanon, S.** 2010. Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Hydrocolloid.* 24: 588-594. (Impact factor 2012 = 3.494)
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Kishimura, H. 2010. Purification and biochemical properties of pepsins from the stomach of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Eur. Food Res. Technol.* 231: 259-269. (Impact factor 2012 = 1.436)
- Chun, B.S., Kishimura, H., Kanzawa, H., Klomklao, S., **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Ando, S. 2010. Application of supercritical carbon dioxide for preparation of starfish phospholipase A₂. *Process Biochem.* 45: 689-693. (Impact factor 2012 = 2.414)

- Kishimura, H., Klomklao, S., **Nalinanon, S.**, Benjakul, S., Chun, B.S. and Adachi, K. 2010. Comparative study on thermal stability of trypsin from the pyloric caeca of threadfin hake (*Laemonema longipes*). *J. Food Biochem.* 34: 50-65. (Impact factor 2012 = 0.76)
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Kishimura, H. 2010. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chem.* 121: 49-55. (Impact factor 2012 = 3.334)
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. 2009. Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous-two phase systems. *Process Biochem.* 44: 471-476. (Impact factor 2012 = 2.414)
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. 2008. Tuna pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus spp.*). *J. Food Sci.* 73: C413-C419. (Impact factor 2012 = 1.775)
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. 2008. Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloid.* 22: 615-622. (Impact factor 2012 = 3.494)
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* 104: 593-601. (Impact factor 2012 = 3.334)

National papers

- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Kishimura, H. 2011. Characterization of collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) solubilized by albacore tuna pepsin. *King Mongkut's Agro-Industry Journal.* 3(1): 53-70.
- Thiansilakul, Y. and **Nalinanon, S.** 2011. Myoglobin-mediated lipid oxidation in fish muscle. *King Mongkut's Agro-Industry Journal.* 3(2): 1-9.

Published Proceeding Papers

- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Kishimura, H. 2013. Characterization of acid solubilized collagen from the skin of Siamese gourami (*Trichogaster pectoralis*). *EUROFOODCHEM XVII*, Istanbul, Turkey, 7th-10th May. Poster presentation.

- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Kihimura, H. 2012. Partial characterization of collagen from pharaoh cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin. 2012 International Conference on Nutrition and Food Sciences (ICNFS 2012). Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society (APCBEEES). Singapore, 23rd-24th July. Oral presentation.
- **Nalinanon, S.** and Benjakul, S. 2010. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. 1st International Congress on Food Technology. Association of Food Technology-Turkey with the support of Akdeniz University, Antalya, Turkey, 3rd-6th November. Poster Presentation.
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S., Kihimura, H. and Saeki, H. 2009. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). The Japanese Society of Fisheries Science, Spring Meeting 2009. Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan, 27th-31st March. Poster Presentation.
- **Nalinanon, S.** and Benjakul, S. 2008. Extraction and characterization of collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) solubilized by albacore tuna pepsin. The 6th Regional IMT-GT UNINET Conference 2008: Sustaining Natural Resources Towards Enhancing the Quality of Life Within the IMT-GT Zone. Penang, Malaysia, 28th-30th August. Poster Presentation.
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2007. Characteristics and functional properties of gelatin from bigeye snapper skin extracted using pepsin-aided process. The 33rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT. 33): Science and Technology for Global Sustainability. Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand, 18th-20th October. Poster Presentation.
- **Nalinanon, S.**, Benjakul, S., Visessanguan, W. and Nagai, T. 2006. Characterization of fish pepsin and its use for gelatin extraction from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) skin. The 8th Agro-Industrial Conference: Food Innovation. Bitec Bangna, Bangkok, Thailand. June 15th-16th. Poster Presentation.
- Sassanarakkit, S., Trangwacharakul, S., **Nalinanon, S.**, Gumarathi, R., Chanpongsri, S., Suntorn, N. and Chansong, R. 2005. Research and development of shrimp feed supplement from feed canning industrial waste in the pilot plant. Class. Invest. No. 44-09, Report No. 8, TISTR., Bangkok, 52p.
- Trangwacharakul, S., Auchariyamet, S., **Nalinanon, S.**, Maksudthipan, S., Arsa, N., Nuanyai, T., Sittisamang, D., Srikumlaithong, S. and Chanpongsri, S. 2004. Process development of concentrated fish soup in pilot plant. Financial analysis on production of concentrated fish soup. Class. Invest. No. 44-09, Report No. 6, TISTR., Bangkok. 118p.