



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดและการจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกล้วยและ

ปลาหมึกกระดอง

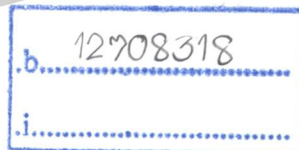
Isolation and characterization of collagen from the skin of splendid squid (*Loligo formosana*) and pharaoh cuttlefish (*Sepia pharaonis*)

นายสิทธิพงศ์ นลินานนท์

RCH

ส ๗๒๕๗

๒๕๕๕



สาขา
เลขทะเบียน 138140
รับเดือนปี 18 ก.ย. 2558

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ชื่อโครงการ การสกัดและการจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกล้วยและปลาหมึกกระดอง

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 100,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 ถึง 30 กันยายน 2555

หัวหน้าโครงการวิจัย นายสิทธิพงษ์ นลินานนท์

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

คอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซินจากหนังปลาหมึกกล้วย (SC) ถูกสกัด ได้ปริมาณผลผลิตเท่ากับ 75.3% (โดยน้ำหนักแห้ง) SC ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์สูง โดยสังเกตได้จากพีคที่โดเด่นที่ A_{232} และการมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนสูง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งพบใน SC เท่ากับ 4.70% (โดยน้ำหนักแห้ง) ซึ่งพบในปริมาณที่สูงกว่าคอลลาเจนจากหนังลูกวัว (CC) (1.45% โดยน้ำหนักแห้ง) ($P < 0.05$) เมื่อตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และรูปแบบการชะพบว่า SC อาจจะประกอบไปด้วยคอลลาเจนผสมกัน (ชนิด SQ-I และ SQ-II) SC ประกอบด้วยไกลซีนและกรดอะมิโนในปริมาณสูง พบการสลายตัวของ CC ด้วยเอนไซม์โคโมทรูปซิน และไลซิลเอนโดเปปติเดสในระดับที่ชัดเจนกว่า SC อุณหภูมิสูงสุดก่อนการเสถียรภาพธรรมชาติ (T_{max}) ของ SC เท่ากับ 34.1°C ซึ่งต่ำกว่าที่พบใน CC ประมาณ 7°C เมื่อพิจารณาสเปกตรัม FTIR ของ SC พบว่าโครงสร้างพันธะสามสายยังคงเป็นโครงสร้างที่โดเด่นและยังพบองค์ประกอบที่เป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตในโครงสร้างอีกด้วย ดังนั้นหนังปลาหมึกกล้วยจึงเป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกใหม่สำหรับการนำมาผลิตคอลลาเจน

คอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (PSC) จากหนังปลาหมึกกระดองถูกสกัด ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยการตกตะกอนด้วยเกลือ และการการไดอะไลซิส ก่อนนำไปทำการจำแนกคุณลักษณะ ปริมาณผลผลิต PSC ที่ได้เท่ากับ 43.7% (โดยน้ำหนักแห้ง) และมีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากพอพิการดูดกลืนแสงที่โดเด่นที่ความยาวคลื่น 232 นาโนเมตร และพบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่พบใน PSC เท่ากับ 3.40% (โดยน้ำหนักแห้ง) ซึ่งพบในปริมาณที่มากกว่าที่พบในคอลลาเจนจากหนังลูกวัว (CC) (1.45% โดยน้ำหนักแห้ง) ($P < 0.05$) เมื่อพิจารณาจากรูปแบบโปรตีนพบว่า PSC ประกอบด้วยคอลลาเจนผสม โดยมี สายแอลฟา และ เบต้า เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญ PSC มีไกลซีนในปริมาณมากและพบกรดอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายได้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ในปริมาณสูง (196 หน่วย จาก 1000 หน่วย) อุณหภูมิสูงสุดก่อนการเสียดสภาพธรรมชาติของ PSC เท่ากับ 34 °ซ ซึ่งต่ำกว่าที่พบใน CC ประมาณ 7 °ซ ดังนั้นวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปลาหมีก กระจกจึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจในการนำไปผลิตคอลลาเจน

คำสำคัญ : การจำแนกคุณลักษณะ, คอลลาเจน, การสกัด, หมีกกระจก, หมีกกล้วย, คอลลาเจนที่ละลายด้วยเปป ซิน, หนังก, วัสดุเศษเหลือ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Research Title: Isolation and characterization of collagen from the skin of splendid squid (*Loligo formosana*) and pharaoh cuttlefish (*Sepia pharaonis*)

Researcher: Sitthipong Nalinanon

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

ABSTRACT

Pepsin solubilized collagen from the skin of splendid squid (SC) was isolated. The yield of SC was 75.3% (dry wt). SC had high purity as shown by the distinct A_{232} peak and high hydroxyproline content. Total sugar content of SC was 4.70% (dry wt), which was higher than that of calf skin collagen (CC) (1.45% dry wt) ($P < 0.05$). Based on SDS-PAGE and elution profile, SC might contained the mixed types of collagen (type SQ-I and SQ-II). SC was rich in glycine and had high content of imino acids. The degradation induced by chymotrypsin and lysyl endopeptidase was more pronounced in CC, compared with SC. T_{max} of SC was 34.1 °C, which was about 7 °C lower than that of CC. FTIR spectra revealed that the triple-helical structure of SC was predominant with the co-presence of carbohydrate moieties. Therefore, the skin of splendid squid can be an alternative source for collagen production.

Pepsin solubilized collagen (PSC) from the skin of pharaoh cuttlefish was isolated, partially purified by salt precipitation and dialysis prior to characterization. The yield of PSC was 43.7% (dry weight). PSC had good purity which showed the distinct UV absorption peak at 232 nm and high hydroxyproline content. Total sugar content of PSC was 3.40% (dry weight), which was higher than that of collagen from calf skin (CC) (1.45% dry weight) ($P < 0.05$). Based on protein pattern, PSC was considered to contain mixed type collagens, in which consisted of α - and β -chains as major components. PSC was rich in glycine and had high content of imino acids (196 residues/1000 residues). The maximum transition temperature (T_{max}) of PSC was 34 °C which was about 7 °C lower than that of CC. Therefore, the skin waste material from cuttlefish processing is one of a promising new source for collagen production as well.

Keywords: Characterization, collagen, extraction, cuttlefish, splendid squid, pepsin solubilized collagen, skin, byproducts

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสกัด และการจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกล้วย และ ปลาหมึกกระดอง ฉบับนี้สามารถทำสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือ กำลังใจ และการสนับสนุนจากบุคคลหลายท่านตลอดมา ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สุทรววัฒน์ เบญจกุล จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทศไทย และ Assoc. Prof. Hideki Kishimura จาก มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ที่สละเวลาอันมีค่า คอยแนะนำให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะ ต่างๆมาโดยตลอด ตลอดจนสนับสนุนการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ ผู้วิจัยขอขอบคุณคุณ โสภาวรรณ บุตรโสภานักศึกษาผู้ช่วยทำงานวิจัย สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้ช่วยทำงานวิจัยที่มีความตั้งใจ และมุ่งมั่นเรียนรู้ เป็นอย่างดี นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณมารดา ภรรยา และลูก ที่คอยให้กำลังใจกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

นายสิทธิพงษ์ นลินานนท์
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	IV
สารบัญ.....	V
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญภาพ.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 คอลลาเจน.....	3
2.2 คอลลาเจนในสัตว์น้ำ.....	4
2.3 การสกัดและการจำแนกคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ.....	6
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของคอลลาเจน.....	8
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	11
3.1 วัสดุดิบ.....	11
3.2 อุปกรณ์เครื่องมือ.....	11
3.3 สารเคมี.....	12
3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง.....	12
3.5 วิธีการทดลอง.....	13
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	16
4.1 ผลศึกษาการสกัดและจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกล้วย (Splendid squid).....	16
4.2 ผลศึกษาการสกัดและจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกระดอง (Pharaoh cuttlefish).....	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการแจ้งขึ้นทะเบียนลิขสิทธิ์ ซึ่งอยู่ภายใต้การคุ้มครองของกฎหมายลิขสิทธิ์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ห้ามนำไปทำซ้ำหรือดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	29
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	29
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	29
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย.....	30
6.1 ผลงานนำเสนอในการประชุมวิชาการนานาชาติ.....	30
บรรณานุกรม	31
ภาคผนวก	37
ภาคผนวก ก การตรวจสอบปริมาณไฮดรอกซีโพรตีน.....	37
ภาคผนวก ข การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry.....	39
ภาคผนวก ค การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Biuret.....	42
ภาคผนวก ง รายละเอียดผลงานวิจัยที่ผลิตได้.....	43
ภาคผนวก จ สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย.....	50
ประวัติผู้วิจัย	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดและการกระจายตัวของคอลลาเจน.....	4
2.2	องค์ประกอบของกรดอะมิโนของคอลลาเจนในสัตว์น้ำและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	5
2.3	น้ำตาลที่พบในคอลลาเจนจากปลาและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง.....	6
4.1	Yield and characteristics of collagen from the skin of splendid squid (SC) and type I collagen from calf skin (CC).....	17
4.2	Amino acid composition of collagen from the skin of splendid squid (SC) and type I collagen from calf skin (CC).....	21
4.3	Yield, hydroxyproline content, total sugar content and UV absorption peak of pepsin-solubilized collagen (PSC) from the skin Pharaoh cuttlefish and type I collagen from calf skin (CC).....	25
4.4	Amino acid composition of pepsin solubilized collagen (PSC) from the skin of Pharaoh cuttlefish skin and type I collagen from calf skin (CC).....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การจัดเรียงตัวของโทรโปคอลลาเจน.....	3
4.1	SDS-PAGE pattern of collagen from the skin of splendid squid (SC) under reducing condition. HMC, M, I, II, III and V denote high-MW cross-linked components, high-MW protein markers, collagen type I, type II, type III and type V, respectively.....	18
4.2	Elution profile of collagen from the skin of splendid squid (SC) on the TOYOPEARL [®] CM-650M ion-exchange column. The fractions indicated by numbers were examined by SDS-PAGE using 5% separating gel and 4% stacking gel. HMC denote high-MW cross-linked component, respectively.....	19
4.3	FTIR spectra of collagen from the skin of splendid squid (SC) and type I collagen from calf skin (CC).....	23
4.4	Peptide maps of collagen from the skin of splendid squid (SC) and type I collagen from calf skin (CC) digested by lysyl endopeptidase or chymotrypsin. M and HMC denote high-MW protein markers and high-MW cross-linked components, respectively.....	16
4.5	SDS-PAGE pattern of pepsin solubilized collagen (PSC) from pharaoh cuttlefish skin under reducing condition. HMC, M, CC, II, III and V denote high-MW cross-linked components, MW protein markers, collagen type I, type II, type III and type V, respectively.....	26
4.6	DSC thermograms of pepsin solubilized collagen (PSC) from the skin of Pharaoh cuttlefish and type I collagen from calf skin (CC) rehydrated in 0.05 M acetic acid.....	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ปลาหมึกสดแช่เย็นและแช่แข็ง รวมทั้งผลิตภัณฑ์ปลาหมึกแปรรูปเป็นสินค้าส่งออกที่มีมูลค่าการส่งออกสูงชนิดหนึ่งของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2553 มีปริมาณการส่งออกรวม 73,638 ตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออกเท่ากับ 12,390 ล้านบาท (กองประมงต่างประเทศ, 2554) โดยมีประเทศญี่ปุ่น กลุ่มประเทศสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา เป็นกลุ่มประเทศคู่ค้าหลักที่นำเข้าปลาหมึกสดและผลิตภัณฑ์จากประเทศไทย ซึ่งปลาหมึกและผลิตภัณฑ์ที่มีการส่งออกจากประเทศไทยนั้นผลิตจากปลาหมึกกล้วย และปลาหมึกกระดอง เป็นหลัก โดยมีปริมาณการนำเข้าปลาหมึกทั้งสองชนิดนี้เพื่อการแปรรูปและส่งออกในปี พ.ศ. 2553 เท่ากับ 37,907 และ 24,832 ตัน ตามลำดับ (กองประมงต่างประเทศ, 2554)

ในระหว่างการแปรรูปปลาหมึก จะก่อให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งที่สำคัญคือน้ำปลาหมึกเป็นจำนวนมาก คิดเป็นร้อยละประมาณ 3-12 ของน้ำหนักปลาหมึกทั้งตัว โดยขึ้นกับสายพันธุ์ของปลาหมึก ส่วนใหญ่โรงงานมักขายน้ำปลาหมึกดังกล่าวให้กับเกษตรกรหรือโรงงานเพื่อนำไปผลิตปุ๋ยและอาหารสัตว์ในราคาถูก แต่เนื่องจากน้ำปลาหมึกมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง ดังนั้นน้ำปลาหมึกจึงเป็นวัสดุเศษเหลือที่มีศักยภาพ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการผลิตเป็นคอลลาเจน ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้จากโรงงานแปรรูปปลาหมึกสด ได้อีกทางหนึ่ง

ปัจจุบันมีการใช้คอลลาเจนอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการผลิตฟิล์ม การผลิตยา เครื่องสำอาง วัสดุชีวภาพทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมอาหาร (Ogawa et al., 2004; Kittiphattanabawon et al., 2005) โดยส่วนใหญ่ประเทศไทยนำเข้าคอลลาเจนในรูปแบบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตเสริมความงาม ในรูปแบบคอลลาเจนเปปไทด์และผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง คิดเป็นมูลค่าการนำเข้าในปี พ.ศ. 2553 รวมเท่ากับ 8,919 ล้านบาท (กรมศุลกากร, 2554) เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตคอลลาเจนส่วนใหญ่ในอุตสาหกรรมผลิตได้จากหนังสุกรและหนังลูกวัว ซึ่งคงมีปัญหาด้านการยอมรับจากผู้บริโภคในปัจจุบัน โดยเฉพาะผู้ที่นับถือศาสนาอิสลามและยิว นอกจากนี้วัตถุดิบดังกล่าวอาจเป็นพาหะของโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) (Fernández-Díaz et al., 2001; Choi and Regenstein, 2000) ได้อีกด้วย

ดังนั้นวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาหมึก โดยเฉพาะน้ำปลาหมึกจากทั้งปลาหมึกกล้วยและปลาหมึกกระดอง จึงเป็นแหล่งวัตถุดิบของคอลลาเจนที่มีศักยภาพ และปราศจากข้อจำกัดดังกล่าว

ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด รวมทั้งยังทำให้ได้ ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการผลิตคอลลาเจนสัตว์น้ำชนิดอื่นๆได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการสกัดและจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกล้วย
- 1.2.2 ศึกษาการสกัดและจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกระดอง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการสกัด คุณสมบัติทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกล้วยและปลาหมึกกระดอง ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาหมึกสด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถสกัดและทราบคุณสมบัติทั้งทางเคมีและกายภาพของคอลลาเจนที่ผลิตได้
- 1.4.2 เป็นแนวทางการผลิตคอลลาเจนจากสัตว์น้ำชนิดต่างๆ
- 1.4.3 ใช้ข้อมูลเพื่อต่อยอดงานวิจัยในอนาคตในด้านการประยุกต์ใช้คอลลาเจนจากปลาหมึกในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทางด้านอาหาร ด้านเภสัชกรรม และด้านวัสดุชีวภาพทางการแพทย์
- 1.4.4 เป็นข้อมูลให้ภาคเอกชน โดยเฉพาะ โรงงานแปรรูปปลาหมึกตื่นตัวในการใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือในการผลิตคอลลาเจน เพื่อทำให้เกิดมูลค่าเพิ่มแก่วัตถุดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

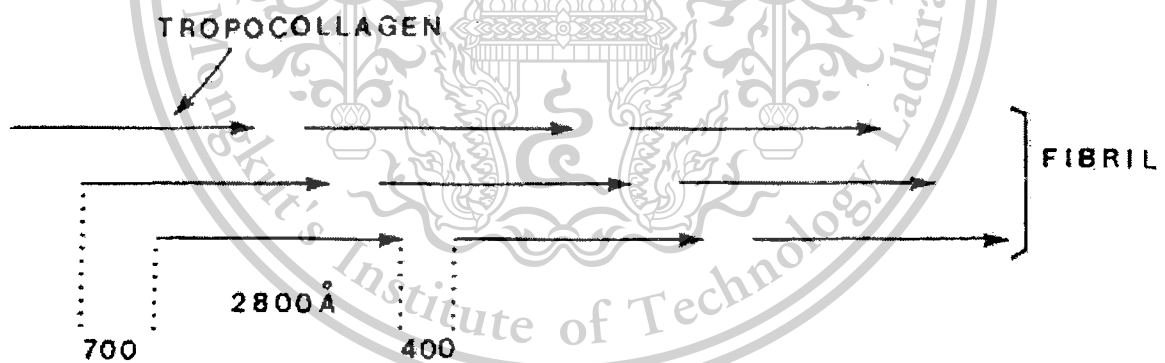
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในหนัง กระดูก เส้นเอ็น กระดูกอ่อน (Foegeding et al., 1996) เส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) มีความหนาประมาณ 1-2 ไมครอน และในแต่ละเส้นใยมีแขนง (branch) เชื่อมต่อกัน เส้นใยประกอบไปด้วยคอลลาเจนไฟบริล (collagen fibril) ขนาดหนาประมาณ 0.3-0.4 ไมครอน ซึ่งประกอบด้วย โทรโปคอลลาเจนที่เป็นหน่วยย่อยของคอลลาเจน และมีการจัดเรียงสลับเหลื่อมกันประมาณ 700 อังสตรอม ($^{\circ}\text{A}$) หรือ 1 ใน 4 ของความยาวของโทรโปคอลลาเจน (Wong, 1989) โทรโปคอลลาเจนมีรูปทรงกระบอกยาวประมาณ 2,800 อังสตรอม และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 14-15 อังสตรอม (ภาพที่ 2.1) ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 3 สาย พันขดไปมาเป็นซูเปอร์เฮลิกซ์ (superhelix) แต่ละสายมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000 เกิดเป็นโทรโปคอลลาเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 300,000 (Foegeding et al., 1996) สายแอลฟาแต่ละสายมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 1,000 หน่วย (Wong, 1989) ระหว่างโมเลกุลของโทรโปคอลลาเจนประกอบด้วย ground substance (โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และน้ำ) ซึ่งช่วยให้โมเลกุลของโทรโปคอลลาเจนเกิดการเชื่อมต่อกันเป็นคอลลาเจนไฟบริล



ภาพที่ 2.1 การจัดเรียงตัวของโทรโปคอลลาเจน

ที่มา: Wong (1989)

สายพอลิเปปไทด์ของคอลลาเจนเกิดจากการเชื่อมต่อกันของไตรเปปไทด์ Gly-X-Y โดยส่วนใหญ่ X คือโพรลีน และ Y คือไฮดรอกซีโพรลีน แต่อาจมีกรดอะมิโนชนิดอื่นสลับอยู่ได้ โทรโปคอลลาเจนอาจประกอบกันด้วยสายเปปไทด์ที่แตกต่างกันหรือเหมือนกัน เช่น $(\alpha 1)_2$ และ $\alpha 2$ หรือ $\alpha 1 \alpha 2$ และ $\alpha 3$ (Kijowski, 2001) โดยทั่วไปคอลลาเจนมี 4 ชนิดหลักดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 2.1 ชนิดและการกระจายตัวของคอลลาเจน

Type	Triple helix	Distribution
I	two identical $\alpha 1(I)$ chain + one $\alpha 2$ chain	Skin, tendon, bone
II	three $\alpha 1(II)$ chains	Intervertebral disc, cartilage
III	three $\alpha 1(III)$ chains	Cardiovascular vessel, uterus
IV	three $\alpha 1(IV)$ chains	Basement membrane, kidney glomeruli, lens capsule

ที่มา: Wong (1989)

กรดอะมิโนหลักที่เป็นองค์ประกอบในคอลลาเจนคือ โกลซีน (ร้อยละ 33) โพรลีน (ร้อยละ 12) และอะลานีน (ร้อยละ 11) และยังมีกรดอะมิโนที่ไม่พบทั่วไปในโปรตีนชนิดอื่นๆ คือ ไฮดรอกซีโพรลีน (ร้อยละ 12) และไฮดรอกซีไลซีน (ร้อยละ 1) (Wong, 1989) โกลซีนที่มีอยู่ในคอลลาเจนประมาณ 1 ในสามของกรดอะมิโนทั้งหมดจะกระจายอย่างสม่ำเสมอในโซ่เปปไทด์ตลอดทั้งโมเลกุลของคอลลาเจน ยกเว้นช่วงกรดอะมิโน 14 ตัวแรก นับจากปลายไนโตรเจน (N-terminus) และช่วงกรดอะมิโน 10 ตัวแรก นับจากปลายคาร์บอน (C-terminus) ซึ่งส่วนปลายเหล่านี้เรียกว่า เทโลเปปไทด์ (telopeptides) โมเลกุลของคอลลาเจนมักไม่พบกรดอะมิโนทริปโตเฟน ดังนั้นคอลลาเจนจึงจัดเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ (Foegeding et al., 1996)

2.2 คอลลาเจนในสัตว์น้ำ

คอลลาเจนในสัตว์น้ำมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับชนิด ระยะการเจริญเติบโต และอาหาร คอลลาเจนมักถูกสะสมในไมโอคอมมาตา และในหนังของสัตว์น้ำ โดยปกติปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำมีประมาณร้อยละ 1-12 ของโปรตีนทั้งหมด และพบในหนังปลาประมาณร้อยละ 1.7-4.6 เนื้อของสัตว์น้ำที่มีคอลลาเจนมากมักมีความเหนียวมากกว่า (Sikorski et al., 1990)

คอลลาเจนจากหนังและกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำ มีความแตกต่างจากคอลลาเจนจากหนังวัวโคที่มีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น 7 ชนิดสูงกว่า แต่มีปริมาณของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนต่ำกว่า (ตารางที่ 2.2) (Sikorski et al., 1990) คอลลาเจนมีคาร์โบไฮเดรต (กลูโคส และกาแลคโตส) ประกอบอยู่ด้วย (ตารางที่ 2.3) โดยจับที่สายเปปไทด์ของไฮดรอกซีไลซีนด้วยพันธะไกลโคซิดิก เกิดเป็น 2-O- α -D-glucosyl-O- β -D-galactosyl-hydroxylysine (Burghagen, 1999) คอลลาเจนในสัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิดประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูง และมี อาราบิโนส ไชโลส ไรโบส อยู่ในปริมาณเล็กน้อย (Sikorski et al., 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของคอลลาเจนในสัตว์น้ำและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Amino acids	Cod	Bigeye snapper	Skate	Grass	<i>Pagus</i>	Porcine	Calf	
	(a)	(b)	(c)	carp ^(d)	<i>major</i> ^(e)	(e)	(f)	
	Skin	Skin	Bone	Muscle	Skin	Scale	Dermis	Skin
Alanine	107	136	129	115	135	133	115	119
Arginine	54	60	46	51	57	49	48	50
Aspartic acid/Asparagine	53	51	47	36	42	43	44	45
Cysteine	0	0	0	0	4	0	0	0
Glutamic acid/Glutamine	80	78	74	78	61	71	72	75
Glycine	342	286	361	356	334	346	341	330
Histidine	8	10	6	8	5	5	7	5
Isoleucine	12	5	5	17	10	7	10	11
Leucine	22	24	25	22	22	18	22	23
Lysine	29	31	25	25	23	26	27	26
Hydroxylysine	7	10	20	6	8	7	7	7
Methionine	15	12	8	9	10	15	6	6
Phenylalanine	12	15	12	12	17	13	12	3
Hydroxyproline	51	77	68	74	65	73	97	94
Proline	103	116	95	83	121	107	123	121
Serine	59	36	34	46	39	41	33	33
Threonine	23	29	25	36	24	24	16	18
Tyrosine	4	4	2	2	2	3	1	3
Valine	19	22	17	25	31	19	22	21
Imino acid *	154	193	163	157	186	180	220	215

* Imino acids include proline and hydroxyproline.

ที่มา: (a) Duan และคณะ (2009), (b) Kittiphattanabawon และคณะ (2005), (c) Mizuta และคณะ (2002), (d) Zhang และคณะ (2007), (e) Ikoma และคณะ (2003), (f) Giraud-Guille และคณะ (2000).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 3 น้ำตาลที่พบในคอลลาเจนจากปลาและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

Collagen sources	Total sugar (%)	Glucose (%)	Galactose (%)	Mannose (%)	Fucose (%)
Bigeye tuna, skin	0.40	0.17	0.19	0.01	0.02
Carp, skin	0.43	0.18	0.20	0.01	0.02
Octopus, body wall	2.89	1.50	1.00	0.05	0.18
Squid, body wall	3.96	2.16	1.44	0.10	0.26
Abalone, foot part	4.18	2.19	1.32	0.13	0.48
Spiny lobster, subcuticular tissue	10.19	5.76	3.84	0.17	0.22
Blue crab, subcuticular tissue	12.45	6.90	4.82	0.52	0.21

ที่มา: Kimura (1972).

2.3 การสกัดและจำแนกคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ

คอลลาเจนสามารถสกัดได้จากหนัง กระดูก และเกล็ดของสัตว์น้ำ (Nomura et al., 1996; Nagai et al., 2002; Ikoma et al., 2003; Mizuta et al., 2003; Jongjareonrak et al., 2005; Muyonga et al., 2004a; Ogawa et al., 2004) Nagai และ Suzuki (2000) สกัดแยกคอลลาเจนจากวัสดุเหลือทิ้งคือ หนัง กระดูก และครีบบปลา 7 ชนิด พบว่าได้ผลผลิตคอลลาเจนจากหนังคิดเป็นร้อยละ 50.1 (Japanese sea-bass) ร้อยละ 49.8 (chub mackerel) และร้อยละ 50.1 (bullhead shark) ผลผลิตคอลลาเจนจากกระดูกคิดเป็นร้อยละ 42.3 (skipjack tuna) ร้อยละ 40.7% (Japanese sea-bass) ร้อยละ 53.6 (ayu) ร้อยละ 40.1 (yellow sea bream) และร้อยละ 43.5 (horse mackerel) และผลผลิตคอลลาเจนจากครีบบคิดเป็นร้อยละ 5.2 (Japanese sea-bass acid-soluble collagen) ร้อยละ 36.4 (Japanese sea-bass acid-insoluble collagen) การสกัดคอลลาเจนเริ่มจากการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน และการกำจัดแร่ธาตุ ก่อนการแช่ในสารละลายกรดเพื่อละลายคอลลาเจน ซึ่งเรียกคอลลาเจนที่สกัดได้ว่า acid-solubilized collagen อย่างไรก็ตามคอลลาเจนที่สกัดได้มีผลผลิตต่ำ ดังนั้นการใช้เปปซินเพื่อย่อยสลายที่บริเวณเทโลเปปไทด์ก่อนการสกัด มีผลให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เรียกคอลลาเจนดังกล่าวว่า pepsin-solubilized collagen (Nagai et al., 2001; Nagai and Suzuki, 2002; Jongjareonrak et al., 2005)

2.3.1 คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด

คอลลาเจนจากหนังหรือกระดูกสามารถสกัดโดยใช้กรดอ่อน Kittiphattanabawon และคณะ (2005) ศึกษาการจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนที่ละลายได้ในกรด (acid-solubilized collagen, ASC) จากหนังและกระดูกปลาทูาทหวาน พบว่าการสกัดคอลลาเจนจากหนังและกระดูกให้ผลผลิตร้อยละ 10.94 และ 1.59 ของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ ในการศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า

คอลลาเจนจากหนังและกระดูกปลาทูาทหวานมีรูปแบบของโปรตีนในลักษณะเดียวกัน ประกอบด้วยแถบโปรตีน $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ และสามารถจำแนกได้เป็นคอลลาเจนชนิด type I อย่างไรก็ตามรูปแบบของโปรตีนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น เมื่ออยู่ใต้เห็นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อสาธารณะ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอลลาเจนจากหนังและกระดูกที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส V8 และไลซิดเอนโดเปปติเดสมีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่แตกต่างกันกับคอลลาเจนจากลูกวัวอย่างชัดเจน คอลลาเจนที่แช่ในสารละลายกรดอะซิติกมีค่า T_{max} และเอนทัลปีลดลงเมื่อเทียบกับคอลลาเจนที่แช่น้ำกลั่น โดยกรดอาจมีผลให้คอลลาเจนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง นอกจากนี้พบว่าคอลลาเจนจากหนังและกระดูกมีการละลายสูงสุดที่พีเอช 2 และ 5 ตามลำดับ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการละลายที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์น้อยกว่าร้อยละ 3 (นน./ปริมาตร) อย่างไรก็ตามการละลายลดลงอย่างมากเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงกว่าร้อยละ 3 (นน./ปริมาตร)

ส่วน Muyonga และคณะ (2004b) จำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (acid soluble collagen, ASC) จากหนังของปลา Nile perch (*Lates niloticus*) วัยอ่อนและที่โตเต็มที่ โดยการสกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.9 โมลาร์ ทำให้ได้ผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 63.1 และ 58.7 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ รูปแบบของคอลลาเจนที่สกัดได้ตรวจสอบโดยการไซ SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยสาย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ปริมาณของ imino acid ของ ASC จาก Nile perch วัยอ่อนและโตเต็มที่เท่ากับร้อยละ 19.3 และ 20 ตามลำดับ ซึ่งพบในปริมาณที่มากกว่าปลาชนิดอื่น ส่วนอุณหภูมิการสูญเสียสภาพธรรมชาติของคอลลาเจนที่สกัดได้คือ 36°C ซึ่งสูงกว่าปลาชนิดอื่นๆ เช่นกัน Sadowska และคณะ (2003) สกัดคอลลาเจนจากหนังของ Baltic cod (*Gadus morhua*) โดยใช้กรดอะซิติก หรือกรดซิตริกในอัตราส่วน 1:6 และ 1:4 ตามลำดับ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ทำให้สามารถสกัดคอลลาเจนได้ร้อยละ 20 และสำหรับการสกัดนาน 24 ชั่วโมงสามครั้งติดต่อกันด้วยกรดซิตริกทำให้ได้คอลลาเจนร้อยละ 85 คอลลาเจนที่สกัดได้สามารถละลายได้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และในน้ำ ได้ร้อยละ 85 และ 15 ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

2.3.2 คอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน

โดยทั่วไปการใช้เปปซินร่วมกับการสกัดคอลลาเจนมีผลให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น Nagai และคณะ (2002) ศึกษาคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังของ ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*) พบว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (pepsin-solubilized collagen, PSC) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์คือ $(\alpha 1)_2\alpha 2$ มีอุณหภูมิการสูญเสียสภาพธรรมชาติเท่ากับ 28°C ซึ่งต่ำกว่าคอลลาเจนหนังหมูประมาณ 9°C ส่วนผลผลิตของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (acid-solubilized collagen, ASC) และคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซินมีปริมาณร้อยละ 10.7 และ 44.7 ตามลำดับ Mizuta และคณะ (2003) ศึกษาชนิดของคอลลาเจนที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของครีบบทองของ skate (*Raja kenogei*) โดยใช้ เปปซิน จากนั้นแยกส่วนเป็นสามส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือ แล้วนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีโดยใช้ ฟอสโฟเซลลูโลสคอลัมน์ พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้มีสามชนิด คือคอลลาเจน Type I และ II ซึ่งเป็นคอลลาเจนหลัก และคอลลาเจนชนิด Type XI เป็นคอลลาเจนรอง นอกจากนี้ Mizuta และคณะ (2002) ทำการสกัดคอลลาเจนจากกล้ามเนื้อส่วนปีกของ skate โดยใช้เปปซิน แล้วแยกส่วนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 20 ก่อนทำให้บริสุทธิ์โดยฟอสโฟเซลลูโลสคอลัมน์ พบว่าส่วนของคอลลาเจนหลักประกอบด้วยแถบแอลฟา 2 แถบ คือ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ และแถบเบต้า และในส่วนของคอลลาเจนรองประกอบด้วยแถบแอลฟา 3

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

แถบ คือ $\alpha 1$ $\alpha 2$ และ $\alpha 3$ ซึ่งจากการศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE รูปแบบของเปปไทด์ และการวิเคราะห์กรดอะมิโน พบว่าคอลลาเจนหลักเป็นชนิด Type I ส่วนคอลลาเจนรองเป็นชนิด Type V

นอกจากนี้ Nishimoto และคณะ (2004) จำแนกชนิดของคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (pepsin-solubilized collagen, PSC) ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (เนื้อปกติ และเนื้อดำ) ของ Japanese amberjack จากนั้นนำมาตกตะกอนแยกส่วนออกเป็นส่วนใหญ่ และส่วนรอง นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ cation-exchange column chromatography และทำการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE รูปแบบของเปปไทด์ และวิเคราะห์กรดอะมิโน พบว่าคอลลาเจนหลักเป็นชนิด Type I ส่วนคอลลาเจนรองเป็นชนิด Type V ชนิดของคอลลาเจนในกล้ามเนื้อปกติ และเนื้อดำที่พบมีรูปแบบของเปปไทด์ และองค์ประกอบกรดอะมิโนคล้ายกัน Nagai และคณะ (2000) สกัดคอลลาเจนจากส่วนที่เป็นร่ม (mesogloea) ของ rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*) ด้วยการใช้เอนไซม์เปปซิน พบว่าได้ปริมาณคอลลาเจนเป็นผลผลิตในปริมาณสูง คือ ร้อยละ 32 ของน้ำหนักแห้ง โดยมีโครงสร้างพื้นฐานของคอลลาเจนคล้ายกับคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซินจาก jellyfish mesogloea ที่รับประทานได้ แต่มีความแตกต่างกันกับคอลลาเจนจาก jellyfish exumbrella ที่รับประทานได้ และคอลลาเจนจาก mesogloea ที่ละลายได้ในกรด คอลลาเจนที่สกัดได้มีอุณหภูมิการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ (Td) เท่ากับ 28 °ซ สายคอลลาเจนเป็นแบบ heterotetramer ประกอบด้วยสาย $\alpha 1$ $\alpha 2$ $\alpha 3$ และ $\alpha 4$ ส่วน Nagai และ Suzuki (2002) พบว่าการสกัดคอลลาเจนจากหนังด้านนอกของ paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้ผลผลิตต่ำคือ ประมาณร้อยละ 5.2 ของน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามส่วนที่ไม่ละลายจากการละลายด้วยกรดสามารถละลายได้ด้วยเปปซิน (ร้อยละ 10) โดยมีผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 50 คอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซินมีลักษณะ heterotrimer คือมีสาย $\alpha 1$ $\alpha 2$ $\alpha 3$ เป็นองค์ประกอบเหมือนกับคอลลาเจนจากหนวดของ *Callistoctopus arakawai* อุณหภูมิการสูญเสียสภาพของคอลลาเจนที่ได้เท่ากับ 27 °ซ ซึ่งต่ำกว่าคอลลาเจนจากหมู 10 °ซ นอกจากนี้ Nagai และคณะ (2001) ทำการสกัดคอลลาเจนจากหนังด้านนอกของปลาหมึกกระดอง (*Spialycidas*) โดยสกัดขึ้นต้นด้วยกรดอะซิติกได้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 2 ของน้ำหนักแห้ง ส่วนที่เหลือจากสกัดนำไปสกัดต่อด้วยเปปซินร้อยละ 10 (น.น./ปริมาตร) ได้ผลผลิตเป็นคอลลาเจนที่ละลายในเปปซินร้อยละ 35 ของน้ำหนักแห้ง คอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซินมีลักษณะเป็น heterotrimer ประกอบด้วยสาย ($\alpha 1$) $2\alpha 2$ เหมือนกับ Japanese common squid นอกจากนี้พบว่ามีอุณหภูมิการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติเท่ากับ 27 °ซ ซึ่งต่ำกว่าคอลลาเจนจากหมูประมาณ 10 °ซ

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของคอลลาเจน

คอลลาเจนจากแหล่งต่างๆ มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับองค์ประกอบของกรดอะมิโน ลำดับของกรดอะมิโน รวมทั้งการจัดเรียงตัวของไฟบริล (Sikorski et al., 1990; Foegeding et al., 1996) ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อคุณสมบัติของคอลลาเจนสามารถสรุปได้ดังนี้ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2.4.1 ปริมาณของกรดอิมิโน

ปริมาณของกรดอิมิโน (imino acid) ซึ่งประกอบด้วยโพรีลิน และไฮดรอกซีโพรีลิน มีผลต่อความคงตัวของคอลลาเจนต่อความร้อน คอลลาเจนที่มีกรดอิมิโนต่ำ จะมีอุณหภูมิการสูญเสียสภาพธรรมชาติต่ำ ซึ่งปริมาณของกรดอิมิโนในคอลลาเจนจะสัมพันธ์กับเขตที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำ (Forgeding et al., 1996) คอลลาเจนจากปลาเขตหนาวจะมีกรดอิมิโนประมาณร้อยละ 16-18 (Norland, 1990) จากการศึกษาของ Muyonga และคณะ (2004b) พบว่ากรดอิมิโนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด จากปลา Nile perch วัยอ่อนและโตเต็มที่มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 19.3 และ 20 ตามลำดับ ซึ่งพบในปริมาณที่มากกว่าปลาชนิดอื่น ส่วนอุณหภูมิการสูญเสียสภาพธรรมชาติของคอลลาเจนที่สกัดได้คือ 36 °ซ ซึ่งสูงกว่าปลาชนิดอื่นๆ เช่นกัน จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดย Circular dichroism แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิการสูญเสียสภาพธรรมชาติของคอลลาเจนจากเกล็ดปลา Pagrus major และ Oreochromis nilocas ขึ้นกับปริมาณของไฮดรอกซีโพรีลินมากกว่าโพรีลิน และจากการศึกษาด้วย Raman spectroscopy พบว่าวงแหวนของไฮดรอกซีโพรีลิน และโพรีลินเกิดการเปลี่ยนแปลงขณะให้ความร้อน (Ikoma et al., 2003)

2.4.2 อายุของสัตว์ และช่วงการอดอาหาร

เมื่อสัตว์มีอายุมากขึ้นการเชื่อมประสาน (cross-links) ของคอลลาเจนมีมากขึ้นส่งผลให้เนื้อสัตว์ที่มีอายุมากมีความเหนียวกว่าเนื้อสัตว์ที่มีอายุน้อยกว่า คอลลาเจนจากสัตว์ที่มีอายุมากกว่าจะมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ต่ำกว่า แต่ต้านทานต่อการพองตัวสูงกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย (Zayas, 1997) ส่วนในเนื้อปลาที่อดอาหารจะมีความเหนียวเพิ่มขึ้นเช่นกัน เนื่องจากในช่วงการอดอาหารมีการใช้โปรตีนคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนไมโอไฟบริลไปเรื่อยๆ ขณะที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันไม่ได้มีการย่อยสลายเพื่อนำไปใช้นอกจากนี้คอลลาเจนที่สะสมในไมโอคอมมาตา และหนัง เกิดการเชื่อมประสานกันระหว่างโมเลกุล ทำให้เนื้อสัมผัสมีลักษณะเหนียวขึ้น (Sikorski et al., 1990; Love et al., 1976)

2.4.3 ชนิด และส่วนอวัยวะสัตว์ที่นำมาสกัดคอลลาเจน

อุณหภูมิที่เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (Td) ของคอลลาเจนจากหนัง กระดูก และครีบ ปลา skipjack tuna, Japanese sea-bass, ayu, yellow sea bream, chub mackerel, bullhead shark และ horse mackerel อยู่ในช่วง 25.0-26.5 °ซ 29.5-30.0°ซ และ 28.0-29.1°ซ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าอุณหภูมิการสูญเสียสภาพธรรมชาติของคอลลาเจนจากหนังหมูประมาณ 7-12 °ซ (Nagai and Suzuki, 2000) ดังนั้นแหล่งวัตถุดิบและอวัยวะหรือชิ้นส่วนของสัตว์น้ำจึงมีผลต่อคุณสมบัติของคอลลาเจน

2.4.4 พีเอช และเกลือ

พีเอช และเกลือมีผลต่อการละลาย ความสามารถในการอุ้มน้ำ ความเหนียว และความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ของคอลลาเจนจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในส่วนกล้ามเนื้อ และหนังของสัตว์น้ำ

(Montero et al., 1991 อ้างโดย Sikorski and Borderias, 1994) คอลลาเจนจากหนังและกระดูกปลาทูน่า มีค่าการละลายสูงสุดที่พีเอช 2 และ 5 ตามลำดับ และสามารถละลายลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไรต์เพิ่มขึ้น (Kittiphattanabawon et al., 2005) จากการศึกษาของ Montero และคณะ (1999) พบว่าคอลลาเจนในกล้ามเนื้อ และหนังของปลา hake ไม่สามารถละลายได้ที่พีเอชเท่ากับ 6 แต่คอลลาเจนมีความหนืดและความสามารถในการละลายได้สูงสุดที่พีเอช 3 ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการละลายของโปรตีนขึ้นกับพีเอชของสารละลาย ที่จุดไอโซอิเล็กตริก (pI) ประจุรวมของโปรตีนเป็นศูนย์ทำให้โปรตีนเกิดการละลายได้น้อยที่สุด ซึ่งหากสารละลายมีพีเอชสูงหรือต่ำกว่า pI มากขึ้นทำให้โปรตีนเกิดการละลายเพิ่มขึ้นได้นั่นเอง ส่วนความเข้มข้นของเกลือในสารละลายจะมีอิทธิพลต่อการละลายของโปรตีน Vojdani (1996) อธิบายว่าที่ความเข้มข้นเกลือต่ำ ๆ โปรตีนมักละลายน้ำได้ หากเพิ่มความเข้มข้นเกลือจะช่วยให้โปรตีนเกิดการละลายได้ขึ้น (salting-in effect) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นจะมีแนวโน้มทำให้การละลายของโปรตีนลดลง และโปรตีนเกิดการตกตะกอน (salting-out effect)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุดิบ

ปลาหมึกกล้วย และปลาหมึกกระดองสด จากแพปลาจังหวัดสงขลา

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. ถูพลาสติก
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 (Memmert 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

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 40-60⁰ซ
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 และ
ห้องปฏิบัติการชีวเคมีคุณภาพสัตว์น้ำ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 วัตถุประสงค์และการเตรียมวัตถุดิบ

นำปลาหมึกกล้วยและปลาหมึกกระดองสด จากแพปลาจังหวัดสงขลา มาแยกเอาเฉพาะหนัง บรรจุในถุงพลาสติกปิดผนึก เก็บในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง ขนส่งมาที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภายในเวลา 14 ชั่วโมง

ส่วนของหนังปลาหมึก กำจัดเศษเนื้อที่ติดอยู่และสิ่งสกปรกออก ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาเย็น ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ 1 ตัดให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5×0.5 ซม.² บรรจุในถุงพอลิเอทิลีน นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาหมึก ดังนี้

โปรตีน (AOAC, 1999)

ไขมัน (AOAC, 1999)

เถ้า (AOAC, 1999)

ความชื้น (AOAC, 1999)

ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Bergman and Loxley, 1963)

3.5.2 ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกล้วยและปลาหมึกกระดอง

สกัดคอลลาเจนจากหนังปลาหมึก โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nalinanon และคณะ (2007) การสกัดในแต่ละขั้นตอนจะดำเนินการที่อุณหภูมิ 4°C

3.5.2.1 การเตรียมหนังปลาหมึกสำหรับการสกัดคอลลาเจน

นำหนังปลาหมึกมาทำการสกัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ด้วยอัตราส่วน 1 : 15 (นน./ปริมาตร) นาน 6 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุก 2 ชั่วโมง) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งมีพีเอชเป็นกลาง ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ สกัดแยกไขมันด้วยสารละลาย butyl alcohol เข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในอัตราส่วน 1 : 10 (นน./ปริมาตร) นาน 18 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุก 6 ชั่วโมง)

3.5.2.2 การสกัดคอลลาเจน

ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกด้วยวิธีดังต่อไปนี้

3.5.2.2.1 สกัดคอลลาเจนโดยวิธีใช้กรด (Acid solubilized collagen)

นำหนังปลาหมึกจากข้อ 3.5.2.1 มาสกัดด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 15 (นน./ปริมาตร) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น เก็บส่วนใสไว้

3.5.2.2.2 สกัดคอลลาเจนโดยวิธีใช้กรดอะซิติกร่วมกับเปปซิน (Acid-pepsin

solubilized collagen) ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

นำหนังปลาหมึกจากข้อ -3.5.2.1 มาแช่ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 15 (นน./ปริมาตร) และเปปซินจากกระเพาะหมู (1% ของน้ำหนักหนังปลาหมึกแห้ง) สกัดที่ อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น เก็บส่วนใสไว้

3.5.2.3 การตกตะกอนคอลลาเจน

นำสารละลายคอลลาเจนที่สกัดจาก 2 วิธี (ข้อ 2.2) มาเติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้น สูงเท่ากับ 2.6 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ Tris-HCl พีเอช 7.5 กวนทิ้งไว้ นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 20,000×g นาน 1 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ นำตะกอนที่ได้มาละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วทำการ ไดอะไลซ์ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนได้สารละลายใส แล้วไดอะไลซ์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น จะได้ สารละลายคอลลาเจนบริสุทธิ์ นำไปทำแห้งโดยการทำแห้งแบบระเหิด (freeze drying)

3.5.3 วิเคราะห์ปริมาณผลผลิต องค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติของคอลลาเจน

วิเคราะห์ปริมาณผลผลิต วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของ คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาหมึกกล้วยและปลาหมึกกระดองด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

3.5.3.1 ปริมาณผลผลิต

- ร้อยละ โดยน้ำหนักวัตถุดิบเปียกและแห้ง
- ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ในรูป Hydroxyproline yield โดยคิดจากร้อยละ โดยน้ำหนักแห้งของ Hydroxyproline ในคอลลาเจนที่สกัดได้ต่อปริมาณ Hydroxyproline ทั้งหมดที่พบในวัตถุดิบ

3.5.3.2 คุณลักษณะและองค์ประกอบทางเคมี

- ตรวจสอบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Bergman and Loxley, 1963) และคอลลา เจน (Nalinanon และคณะ, 2010)
- ตรวจสอบปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม ด้วยวิธี Phenol-sulfuric method (Fournier, 2005)
- ตรวจสอบการดูดกลืนแสงยูวี ในช่วงความยาวคลื่น 190-350 นาโนเมตร (Nalinanon และคณะ, 2010)
- ตรวจสอบองค์ประกอบของกรดอะมิโน โดยไฮโดรไลส์คอลลาเจนใน HCl เข้มข้น 6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ กรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง Amino acid analyzer (Nagai และคณะ, 2001)
- ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนโดยใช้วิธี SDS-PAGE โดยใช้ 4% Stacking gel และ 7.5% running gel (Leamli, 1970)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- ตรวจสอบองค์ประกอบย่อยของคอลลาเจนด้วยเทคนิค TOYOPEARL® CM-650 column chromatography (Kittiphattanabawon และคณะ, 2010; Nalinanon และคณะ 2010)
- ตรวจสอบรูปแบบการย่อยสลายคอลลาเจนด้วยเอนไซม์โปรติเอสจำเพาะ (Nalinanon และคณะ, 2010)

3.5.3.3 คุณสมบัติทางกายภาพ

- ตรวจสอบอุณหภูมิสูงสุดที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (Maximum transition temperature, T_{max}) และเอนทัลปีของคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกที่สกัดได้ โดยวิธี Differential Scanning Colorimetry (DSC) ตามวิธีของ Rochdi และคณะ (2000)
- ตรวจสอบโครงสร้างของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (Nalinanon และคณะ, 2010)
- ตรวจสอบศักย์ซีต้า (Zeta (ζ)-potential) ของคอลลาเจนในช่วงพีเอช 1-11 (Nalinanon และคณะ, 2010)
- ตรวจสอบการละลายของคอลลาเจน ในช่วงพีเอช 1-10 และในสถานะที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0 - 6 ตามวิธีของ Montero และคณะ (1991)

3.5.4. การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละสิ่งทดลองทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Steel and Torrie, 1980) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลศึกษาการสกัดและจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกล้วย (Splendid squid)

4.1.1 Yield and characteristics of splendid squid collagen (SC)

Collagen from squid skin was extracted with the aid of pepsin with the yield of 75.3 % (dry wt.) (Table 4.1). Yield was markedly increased in comparison with acid solubilised collagen (6.27%) (data not shown). The result indicated that pepsin was effective in increasing the extraction efficacy of collagen. Hydroxyproline content in SC (98.5 mg/g dry wt.) was lower than that of calf skin collagen (CC) (104 mg/g dry wt.). Rigby (1968) reported that hydroxyproline contents vary with species, environment and body temperature of fish. Both SC and CC contained the carbohydrate. Glucose and galactose are attached to hydroxylysine residues of the peptide chain by O-glycosidic bonds to form 2-O- α -D-glucosyl-O- β -D-galactosyl-hydroxylysine and O- β -D-galactosyl-hydroxylysine (Belitz, Grosch & Schieberle, 2009). Glycosylgalactosylhydroxylysine in collagen from sea cucumber was reported (Saito, Kunisaki, Urano & Kimura, 2002). From UV-Vis spectra, both collagens had the same absorption peak at 232 nm. Very low absorbance at 280 nm of both SC and CC (data not shown) indicated the absence of non-collagenous proteins. Collagen commonly has a low amount of tyrosine, which could absorb UV-light at 280 nm (Duan et al., 2009). Thus, collagens from the skin of splendid squid was extracted with negligible contamination of other proteins.

Based on thermal properties analysis, the maximum transition temperature (T_{max}) and total denaturation enthalpy (ΔH) of SC and CC are presented in Table 1. T_{max} and ΔH of SC ($T_{max} = 34.1$ °C; $\Delta H = 0.656$ J/g) were lower than that found in CC ($T_{max} = 40.8$ °C; $\Delta H = 1.204$ J/g) ($P < 0.05$). This might be owing to the lower content of its imino acids (hydroxyproline and proline) (Table 2). SC showed higher thermal stability than collagens from cold water fish, including cod (15 °C) and deep-sea redfish (16.1 °C) (Sadowska et al., 2003; Wang et al., 2007). Thermal stability of SC was similar to that of collagen from tropical fish, including brownbanded bamboo shark skin (34.4 °C), blacktip shark skin (34.2 °C), black drum skin (34.2 °C) and sheephead seabream (34 °C) (Kittiphattanabawon et al., 2010a; Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan & Shahidi, 2010c; Ogawa et al., 2003). The difference in thermal properties amongst collagens from mammal, tropical fish and cold water fish was correlated with their imino acid content (proline and hydroxyproline), body temperature and environmental temperature

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
(Kittiphattanabawon et al., 2005; Nagai, Suzuki & Nagashima, 2008). Thermal stability of collagen is
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

associated with the restriction of the secondary structure of the polypeptide chain governed by the pyrrolidine rings of proline and hydroxyproline and partially by the hydrogen bonding through the hydroxyl group of hydroxyproline (Benjakul et al., 2010; Liu et al., 2015; Piez & Gross, 1960).

Table 4.1 Yield and characteristics of collagen from the skin of splendid squid (SC) and type I collagen from calf skin (CC).[†]

Characteristics	SC	CC
Yield (% dry weight)	75.3 ± 1.20	-
Hydroxyproline (mg/g dry sample)	98.5 ± 1.43 ^{at}	104 ± 2.45 ^b
Total sugar content (% dry weight)	4.70 ± 0.39 ^b	1.45 ± 0.20 ^a
UV absorption peak (nm)	232 ± 0.30 ^a	232 ± 0.13 ^a
T _{max} (°C)	34.1 ± 0.10 ^a	40.8 ± 0.20 ^b
ΔH (J/g)	0.66 ± 0.04 ^a	1.20 ± 0.07 ^b

[†] Mean ± SD from triplicate determinations.

[‡] Different letters in the same row indicate the significant difference (P<0.05).

4.1.2 Protein patterns and subunit composition of SC

Protein patterns of SC determined under reducing condition is shown in Figure 4.1. SC comprised α - and β -chains as major components with low content of γ -chain. Protein pattern of SC was quite different from that of collagen type I, II, III and V. Two different α -chains were presented in SC and α -chain with MW of 127 kDa was the dominant component. It indicated that SC might contain at least two types of collagen. From the elution profiles of SC on the TOYOPEARL[®] CM-650M column (Figure 4.2), single peak containing different collagen components was obtained. There were four distinct α -chains (band a, b, c and d) and cross-linked components (β - and γ -chains) (fraction nos. 26 and 28). The collagen components, especially α -chain, of SC were in accordance with that of collagen from the skin of squid (*Toparodes pacificus*), which contained two types of collagen, type SQ-I and SQ-II (Mizuta, Yoshinaka, Sato & Sakaguchi, 1994). Therefore, SC most likely consisted of type SQ-I and SQ-II. However, the components of SC in the present study was quite different from those found in collagen from the skin of octopus (*Octopus vulgaris*) and cuttlefish (*Sepia lycidas*), which comprised two distinct α chains, α_1 and α_2 with a molar ratio of 2:1 (Kimura, Takema & Kubota, 1981; Nagai et al., 2001).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and create the document when use.

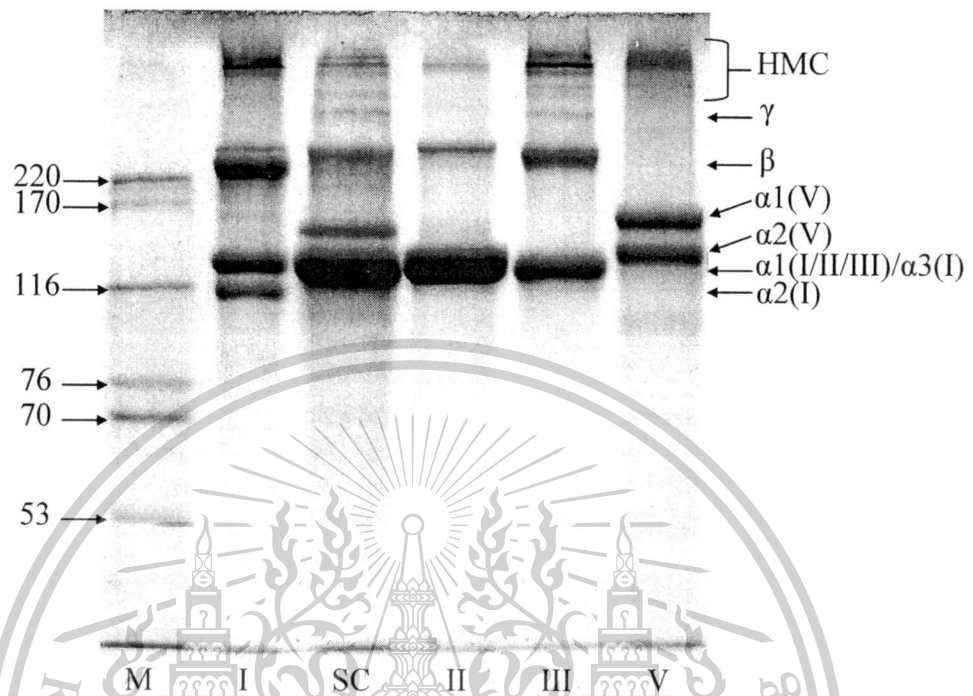


Figure 4.1 SDS-PAGE pattern of collagen from the skin of splendid squid (SC) under reducing condition. HMC, M, I, II, III and V denote high-MW cross-linked components, high-MW protein markers, collagen type I, type II, type III and type V, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

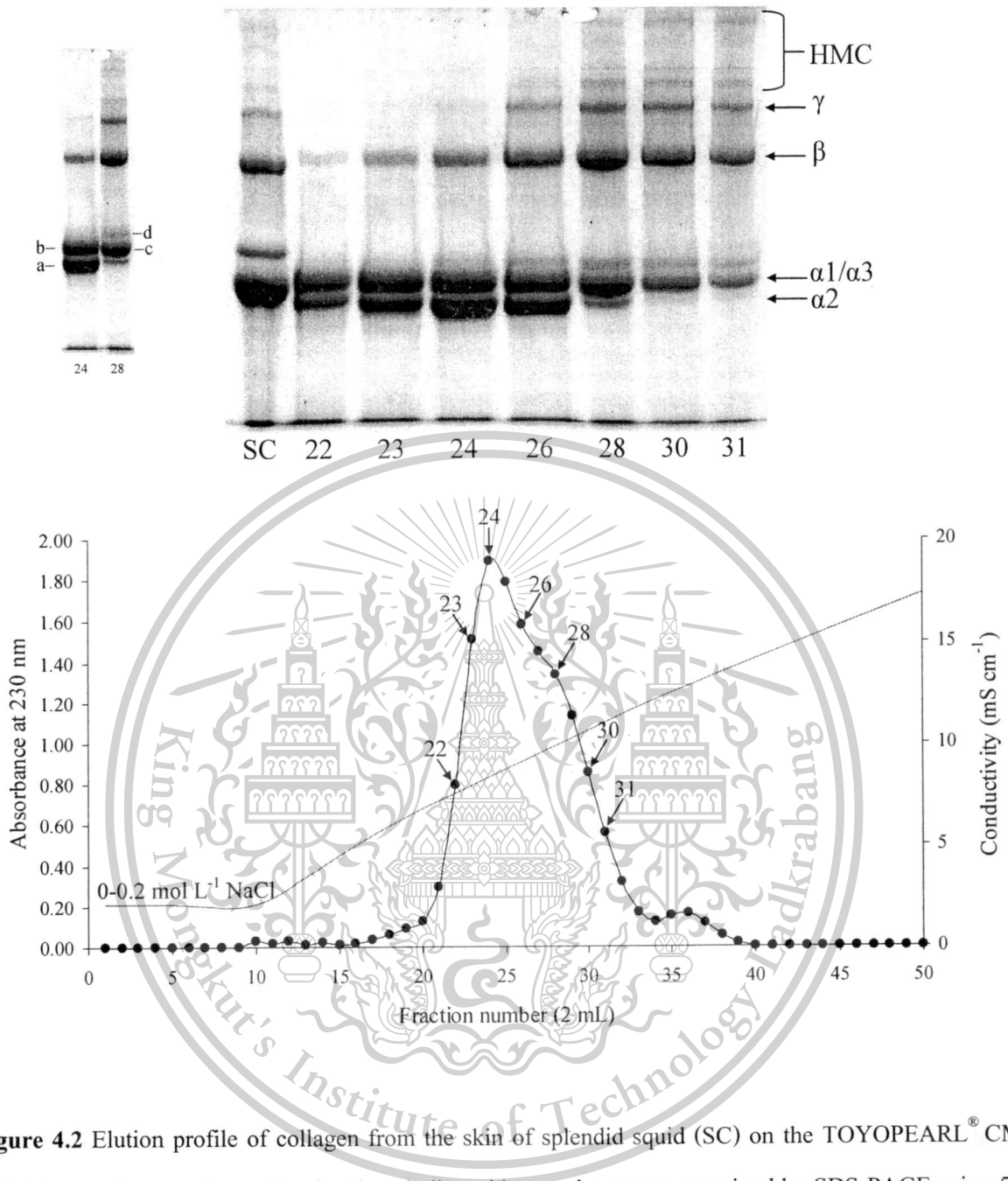


Figure 4.2 Elution profile of collagen from the skin of splendid squid (SC) on the TOYOPEARL® CM-650M ion-exchange column. The fractions indicated by numbers were examined by SDS-PAGE using 5% separating gel and 4% stacking gel. HMC denote high-MW cross-linked component, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.1.3 Amino acid composition of SC and CC

The amino acid composition of SC and CC expressed as residues per 1000 total amino acid residues is shown in Table 4.2. Both collagens had glycine as their major amino acid (330-331 residues/1000 residues) and rich in alanine (88-119 residues/1000 residues), proline (98-121 residues/1000 residues) and hydroxyproline (91-94 residues/1000 residues). Generally, glycine is about one-third of the total amino acid residues. Proline and hydroxyproline constitute about one-fifth and alanine is for about one-ninth of total amino acids in collagen (Balian & Bowes, 1977). Furthermore, they had relatively low contents of methionine, lysine, phenylalanine, hydroxylysine, histidine, tyrosine, tryptophan and no cysteine. When comparing amino acid composition between both collagens, SC had much lower content of alanine and proline. The results were in agreement with collagen from octopus arm (*Callistoctopus arakawai*) and outer skin of cuttlefish (*Sepia lycidas*) (Nagai et al., 2002; Nagai et al., 2001). Additionally, the similar results were also observed in collagen from the skin of other fish species such as arabesque greenling (Nalinanon et al., 2010), blacktip and brownbanded bamboo shark (Kittiphattanabawon et al., 2010a; Kittiphattanabawon et al., 2010c), bigeye snapper (Benjakul et al., 2010; Kittiphattanabawon et al., 2005) and unicorn leatherjacket (Ahmad, Benjakul & Nalinanon, 2010). The imino acid content (proline + hydroxyproline) of SC was 189 residues/1000 residues, which was much lower than that of calf skin collagen (215 residues/1000 residues). However, it was much higher than that of skin collagen from cold water fish species (154-160 residues/1000 residues) such as cod (Duan et al., 2009), arabesque greenling (Nalinanon et al., 2010) and deep-sea redfish (Wang et al., 2007). The imino acid of fish collagens has been known to correlate with the water temperature of their normal habitat (Foegeding et al., 1996). The sensitivity of collagen to heat is associated with its superhelical structure that is maintained by the conformational restrictions imposed by the pyrrolidine rings of the imino acids (hydroxyproline and proline) (Liu et al., 2015). Hydroxyproline plays an important role in stabilisation of the helix structure by preventing rotation of the N-C bond (Foegeding et al., 1996). With reference to hydroxyproline content, the conversion factor of hydroxyproline to collagen from the skin of splendid squid was calculated to be 9.20. The conversion factors of collagen from other sources such as ornate threadfin bream (12.72) (Nalinanon, Benjakul, Kishimura & Osako, 2011) and Baltic cod skin (14.7) (Sadowska et al., 2003) have been reported. This factor might be useful for estimation of the collagen content in raw material and the yield of extraction as well as purity assessment of resultant collagen.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Table 4.2 Amino acid composition of collagen from the skin of splendid squid (SC) and type I collagen from calf skin (CC).

Amino acid	SC	CC
Alanine	88	119
Arginine	56	51
Aspartic acid/asparagine	57	45
Cysteine	0	0
Glutamic acid/glutamine	83	75
Glycine	331	330
Histidine	6	5
Isoleucine	19	11
Leucine	28	23
Lysine	12	26
Hydroxylysine	17	7
Methionine	14	6
Phenylalanine	11	3
Hydroxyproline	91	94
Proline	98	121
Serine	35	39
Threonine	25	18
Tyrosine	5	3
Tryptophan	1	3
Valine	23	21
Total	1000	1000
Imino acids ^a	189	215

^a Imino acids include proline and hydroxyproline.

4.1.4 Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra of SC and CC

FTIR spectra in the range 4000-650 cm^{-1} of SC and CC are presented in Figure 4.3. SC exhibited FTIR spectrum in which the absorption bands were situated in the amide band region, including the peak of amide I, amide II, amide III, amide A and amide B. The wavenumber of each amide band was

quite similar to that found in collagens from the skin of other fish (Benjakul et al., 2010; Kittiphattanabawon et al., 2010a; Kittiphattanabawon et al., 2010c; Muyonga, Cole & Duodu, 2004b; Nalinanon et al., 2010). FTIR spectra of both collagens were slightly different. It might be caused by the difference in extraction process used, their amino acid compositions and amino acid sequence between both collagens. The amide A bands of SC and CC were observed at 3290 and 3296 cm^{-1} , respectively. This band is generally associated with the N-H stretching vibration and shows the existence of hydrogen bonds. Doyle *et al.* (1975) reported that a free N-H stretching vibration commonly occurs in the range of 3400-3440 cm^{-1} . When the NH group of a peptide is involved in a hydrogen bond, the position is shifted to lower frequencies. Amide B band of SC (2921 cm^{-1}) and CC (2933 cm^{-1}) was related with asymmetrical stretch of CH_2 stretching vibration (Abe & Krimm, 1972). The differences in wavenumber and amplitude of Amide A and B found in SC and CC indicated that secondary structure of both collagens might be different in some extents.

Amide I, II and III peak of SC was found at wavenumber of 1643, 1541 and 1233 cm^{-1} , respectively. Payne and Veis reported that (1988) the amide I peak associated with C=O stretching vibration or hydrogen bond coupled with COO^- . Moreover, it is a sensitive marker for the secondary structure of proteins analysis in FTIR analysis (Surewicz & Mantsh, 1988). While the amide II peak resulted from N-H bending vibration coupled with CN stretching vibration (Krimm & Bandekar, 1986). Generally, the amide I, II and III of peptide linkage have been found at 1600-1690, 1480-1575 and 1229-1301 cm^{-1} , respectively (Krimm et al., 1986). Muyonga et al. (2004b) reported that shift of amide I, II and III peaks to lower wavenumbers are associated with increased intermolecular interactions (by hydrogen bonding) in collagen. The ratio between amide III and 1454 cm^{-1} peak of SC was 1.02. Generally, the ratio of approximately 1.0 reveals the triple-helical structure of collagens (Plepis, Goissis & Das-Gupta, 1996). The result indicated that the triple helical structure might be slightly affected by pepsin digestion during collagen extraction. When pepsin cleaved telopeptide regions of tropocollagen, the secondary structure of resulting PSC might be altered to some degree (Benjakul et al., 2010; Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan & Shahidi, 2010b). Collagen from the skin of splendid squid exhibited absorptions at 1031, 1060 and 1081 cm^{-1} , which arise from the C-OH stretching vibrations of the carbohydrate moieties attached to the protein (Petibois et al., 2006). The similar result was also found in CC. The result suggested that the collagens might contain carbohydrates, which are attached to hydroxylysine residues of the polypeptide chain by O-glycosidic bonds. The result was also in accordance with total carbonyl content (Table 1).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

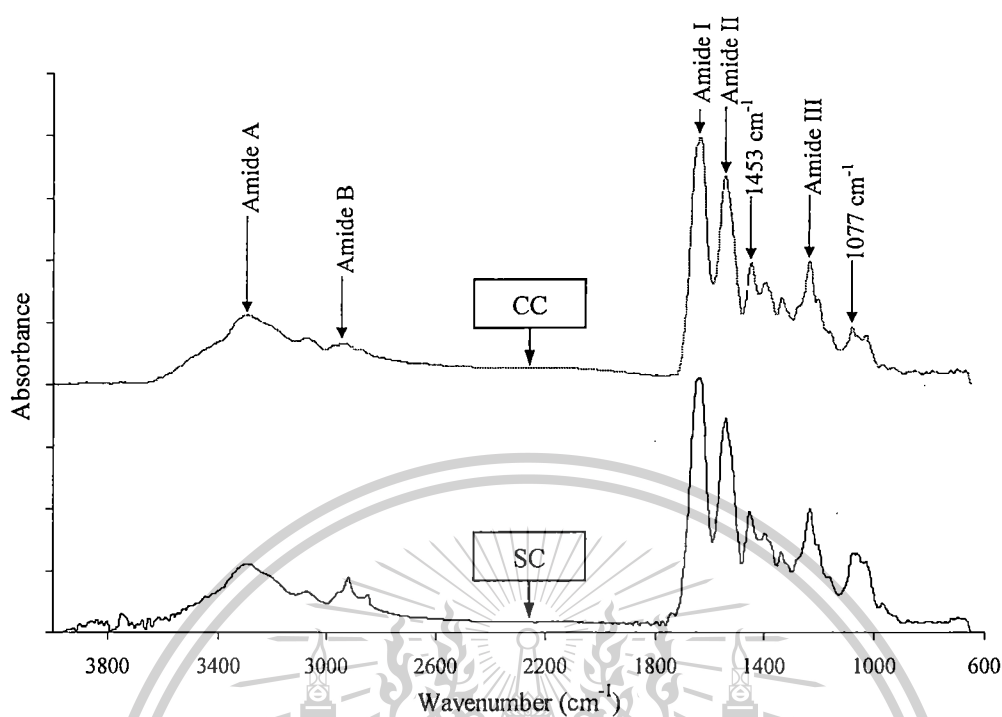


Figure 4.3 FTIR spectra of collagen from the skin of splendid squid (SC) and type I collagen from calf skin (CC).

4.1.5 Peptide mapping of SC and CC

The peptide maps of SC digested by chymotrypsin or lysyl endopeptidase, in comparison with that of CC, are shown in Figure 4.4. Major components, including α , β , γ -chains and high MW cross-linked components, of SC were hydrolysed into degradation peptides with MW of 68.3, 53.2, 47.8, 38.7, 34.7 kDa and low MW peptides (Lane 4), whilst CC was hydrolysed into MW 108.6, 100.4, 85.5, 71.9, 67.4, 38.7 kDa and low MW components after being treated with chymotrypsin (Lane 5). For peptide maps of collagens digested by lysyl endopeptidase, major components of CC were much degraded into lower MW peptides, especially peptide with MW of 33.8 kDa and low MW components (Lane 6). In contrast, lower number of degradation bands was found in SC (Lane 7). The result suggested that SC was more tolerant to hydrolysis by lysyl endopeptidase than CC. This might be due to the higher content of lysine in CC (Table 2). Chymotrypsin catalyses the hydrolysis of peptide bonds on the carboxyl side of hydrophobic amino acid residues, such as phenylalanine, tyrosine, tryptophan and leucine (Boyer, 2006), whilst lysyl endopeptidase prefers to hydrolyse peptide bonds at the carboxyl side of lysyl residues (Jekel, Weijer & Beintema, 1983). Due to the specificity of cleavage sites of both proteases, the marked

difference in peptide maps of SC and CC was observed. The result revealed that the primary structure of SC and CC was completely different, especially in terms of their sequence and composition of amino acids.

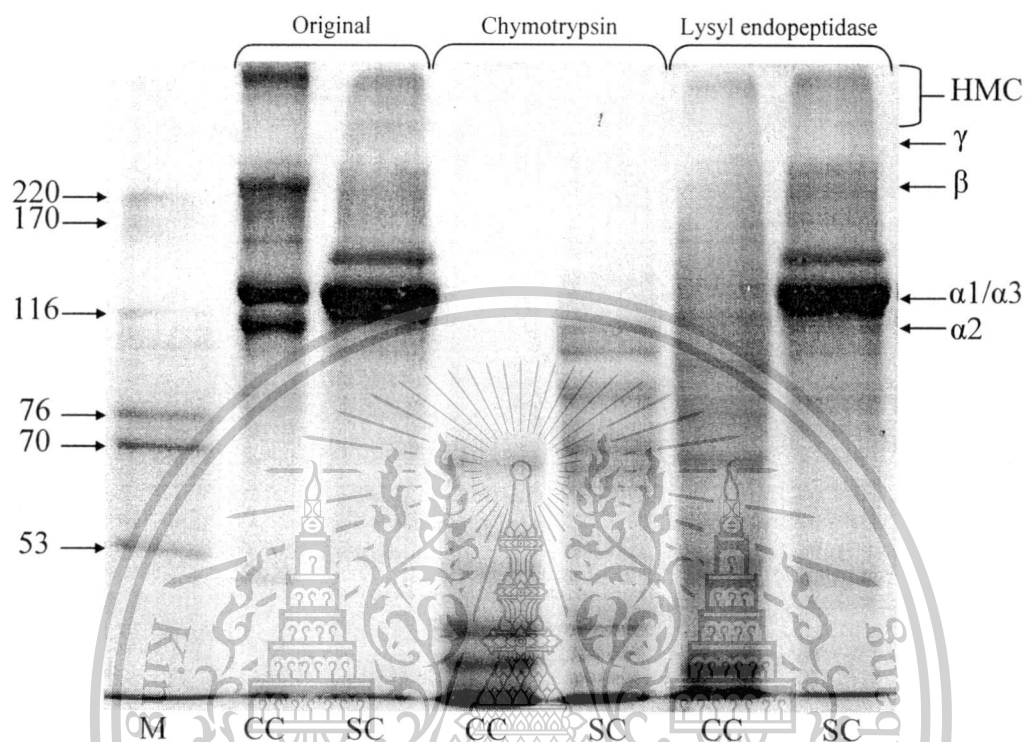


Figure 4.4 Peptide maps of collagen from the skin of splendid squid (SC) and type I collagen from calf skin (CC) digested by lysyl endopeptidase or chymotrypsin. M and HMC denote high-MW protein markers and high-MW cross-linked components, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.2 ผลศึกษาการสกัดและจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกระดอง (Pharaoh cuttlefish)

4.2.1 Yield and some characteristics of pepsin solubilized collagen (PSC) from the skin of Pharaoh cuttlefish

The yield and some characteristics of PSC isolated from the skin of pharaoh cuttlefish is shown in Table 4.3. As per our preliminary study, the yield of acid-solubilized collagen (ASC) was negligible when 0.5 M acetic acid was only used as extracting solution (data not shown). Pepsin was further used as the aid for collagen extraction. The yield of resultant collagen (PSC) was 43.7% (dry weight). Hydroxyproline content of PSC and CC was 113 and 104 mg/g dry sample, respectively. From UV absorption spectra of both PSC and CC, an absorbance at 232 nm with the highest intensity was observed with no absorption peak at 280 nm (data not shown). The results indicated high efficacy of non-collagenous protein removal in PSC preparation. PSC had higher total sugar content than CC ($P < 0.05$). The hydroxylysine-linked carbohydrates may have an impact on the structure of the fibrils in the invertebrate collagen (Sikorski et al., 1990).

Table 4.3 Yield, hydroxyproline content, total sugar content and UV absorption peak of pepsin-solubilized collagen (PSC) from the skin Pharaoh cuttlefish and type I collagen from calf skin (CC).[†]

	PSC	CC
Yield (% dry weight)	43.7 ± 0.90	-
Hydroxyproline content (mg/g dry sample)	113 ± 6.18b [‡]	104 ± 2.45a
Total sugar content (% dry weight)	3.40 ± 0.17b	1.45 ± 0.20a
UV absorption peak (nm)	232 ± 0.05a	232 ± 0.13a

[†] Mean ± SD from triplicate determinations.

[‡] Different letters in the same row indicate the significant difference ($P < 0.05$).

4.2.2 Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein patterns of collagens under reducing condition are shown in Figure 4.5. Differences in protein patterns of different collagens were observed. The result revealed that PSC comprised β and α chains as the major constituents. With respect to PSC, It possibly contained both $(\alpha 1)_3$ homotrimer and $(\alpha 1)_2\alpha 2$ or $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ heterotrimer.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

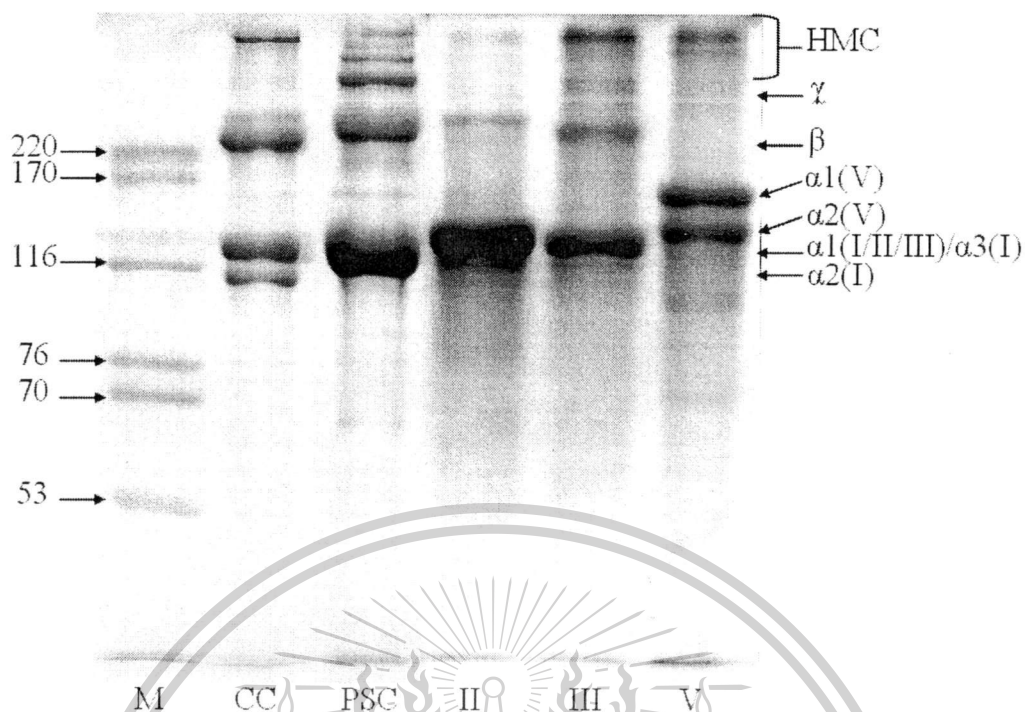


Figure 4.5 SDS-PAGE pattern of pepsin solubilized collagen (PSC) from pharaoh cuttlefish skin under reducing condition. HMC, M, CC, II, III and V denote high-MW cross-linked components, MW protein markers, collagen type I, type II, type III and type V, respectively.

4.2.3 Amino acid composition

The amino acid composition, expressed as residues per 1000 total residues, is shown in Table 4.4. This shows that glycine was the most abundant amino acid in both collagens. PSC had relatively high contents of proline, hydroxyproline and alanine, decreasing in that order. The value of imino acids (proline and hydroxyproline) found in PSC and CC was 196 and 215 residues, respectively.

Table 4.4 Amino acid composition of pepsin solubilized collagen (PSC) from the skin of Pharaoh cuttlefish skin and type I collagen from calf skin (CC).

Amino acid	PSC	CC
Alanine	83	119
Arginine	60	51
Aspartic acid/asparagine	59	45

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 Cysteine 0
 Glutamic acid/glutamine 82

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Glycine	331	330
Histidine	7	5
Isoleucine	20	11
Leucine	26	23
Lysine	12	26
Hydroxylysine	14	7
Methionine	15	6
Phenylalanine	10	3
Hydroxyproline	96	94
Proline	100	121
Serine	40	39
Threonine	23	18
Tyrosine	4	3
Tryptophan	1	3
Valine	18	21
Total	1000	1000
Imino acids	196	215

a Imino acids include proline and hydroxyproline

4.2.4 Thermal stability

DSC thermogram of PSC and CC rehydrated in 0.05 M acetic acid are shown in Figure 4.6. The maximum transition temperature (T_m) and total denaturation enthalpy (ΔH) of PSC was 34.0 °C and 1.164 J/g, respectively, which were lower than that of CC ($T_m = 40.7$ °C; $\Delta H = 1.204$ J/g). This might be owing to the lower content of imino acids (hydroxyproline and proline) of collagen from the skin of pharaoh cuttlefish. The differences in denaturation temperature of collagen from different sources might be determined by different contents of imino acids (proline and hydroxyproline) (Ogawa et al., 2003; Jongjareonrak, et al., 2005). Imino acid content shows a direct positive correlation with the thermal stability of protein via the formation of hydrogen bonds, through the hydroxyl group of hydroxyproline (Jongjareonrak, et al., 2005; Sikorski et al., 1984; Zhang et al., 2007).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

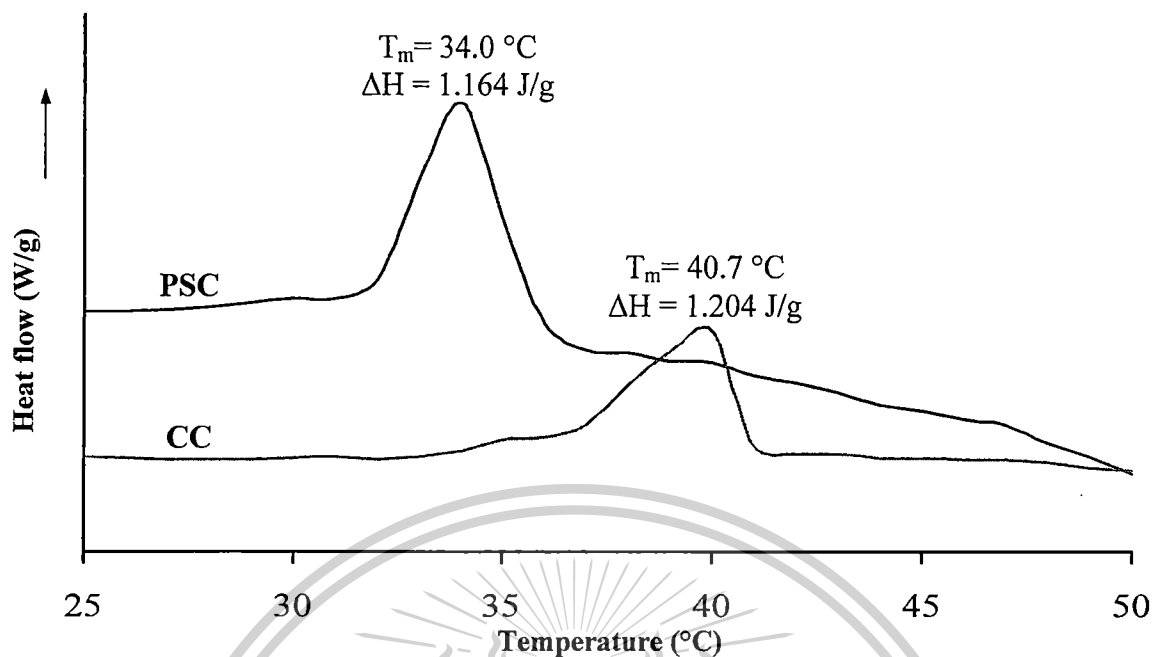


Figure 4.6 DSC thermograms of pepsin solubilized collagen (PSC) from the skin of Pharaoh cuttlefish and type I collagen from calf skin (CC) rehydrated in 0.05 M acetic acid.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 สรุปผลการศึกษาการสกัดและจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกล้วย

Collagen could be extracted from the skin of splendid squid with the aid of pepsin. The resultant collagen was glycoprotein and comprised SQ-I and SQ-II components. However, identification of collagen type using additional separating technique or immunochemical detection or enzymatic treatment should be further conducted.

5.1.2 สรุปผลการศึกษาการสกัดและจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลาหมึกกระดอง

Extraction of collagen from the skin of pharaoh cuttlefish could be achieved by pepsin solubilization under acidic condition. PSC from pharaoh cuttlefish was characterized biochemically and physicochemically. It contained mixed type collagens that α - and β -chains were the major components. PSC presented high imino acid content (196 residues/1000 residues) and transition temperature (34 °C).

5.2 -ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสมบัติทางเคมีกายภาพ และการแปรสภาพคอลลาเจนให้มีสมบัติทางชีวเคมีที่เป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรม และด้านอาหาร ซึ่งจะเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่หนังปลาหมึกกล้วยและปลาหมึกกระดอง ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปปลาหมึกในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

6.1 ผลงานนำเสนอในการประชุมวิชาการนานาชาติ (ภาคผนวก ง)

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.

6.2 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (อยู่ระหว่างส่งผลงาน)

Kittiphattanabawon, P., Nalinanon, S., Benjakul, S. and Kihimura, H. 2015. Characteristics of pepsin-solubilised collagen from the skin of splendid squid (*Loligo formosana*). Food Chemistry. (Submitted)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บรรณานุกรม

กรมศุลกากร. (2554). Import-Export Statistics (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.customs.go.th> [23 กรกฎาคม 2554]

กองประมงต่างประเทศ. (2554). การส่งออกหมึก ปี 2542-2553 (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.fisheries.go.th/foreign/index.php?option=com_content&view=category&id=36&Itemid=32 [23 กรกฎาคม 2554]

AOAC. (1999). Official Method of Analysis. 16th ed. Association of Official Chemists. Washington, D. C.

Abe, Y., & Krimm, S. (1972). Normal vibrations of crystalline polyglycine I. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 11(9), 1817-1839.

Ahmad, M., Benjakul, S., & Nalinanon, S. (2010). Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 588-594.

Balian, G., & Bowes, J. H. (1977). The structure and properties of collagen. In: A. G. Ward, & A. Courts, *The science and technology of gelatin* (pp. 1-31). London: Academic Press.

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Leipzig, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Bergman, I., & Loxley, R. (1963). Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Analytical Chemistry*, 35, 1961-1965.

Burghagen. (1999). Collagen. In *Food Chemistry*. 2nd ed. (Belitz, H. D. and Grosch, W., eds.). p. 540-547. Springer-verlag Berlin Heidelberg. Berlin.

Benjakul, S., Thiansilakul, Y., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Kishimura, H., Prodpran, T., & Meesane, J. (2010). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(1), 132-138.

Boyer, R. (2006). Enzyme II: Cofactors, regulation and catalytic RNA. In: R. Boyer, *Conceptes in biochemistry* (p. 178): John Willey & Son, Inc.

Choi, S. S., & Regenstein, J. M. (2000). Physiochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, 65, 194-199.

Doyle, B. B., Blout, E. R., & Bendit, E. G. (1975). Infrared spectroscopy of collagen and collagen like polypeptides. *Biopolymers*, 14(5), 937-957.

เอกสารนี้เป็นเอกสารของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., & Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112(3), 702-706.
- Fernandez-Diaz, M. D., Montero, P., & Gomez-Guillen, M. C. 2001. Gel properties of collagen from skin of cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*) and their modification by coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase. *Food Chemistry*, 74, 161-167.
- Foegeding, E. A., Lanier, T. C., & Hultin, H. O. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. In: O. R. Fennema, *Food Chemistry* (pp. 879-942). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Fournier, E. (2005). Basic protocol: Determination of reducing and nonreducing sugars using the phenol-sulfuric acid assay. In: R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. Smith, & P. Sporns, *Handbook of food analytical chemistry* (pp. 653-655). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Giraud-Guille, M.-M., Besseau, L., Chopin, C., Durand, P., & Herbage, D. (2000). Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials*, 21, 899-906.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., & 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.
- Jekel, P. A., Weijer, W. J., & Beintema, J. J. (1983). Use of endoproteinase Lys-C from *Lysobacter enzymogenes* in protein sequence analysis. *Analytical Biochemistry*, 134(2), 347-354.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93(3), 475-484.
- Kijowski, J. (2001). Muscle Proteins. In *Chemical & Functional Properties of Food Proteins*. (Sikorski, Z. E., ed.). p. 233-264. Technomic Publishing Co., Inc.. Lancaster.
- Kimura, S. (1972). Studies on marine invertebrate collagen type V. The neutral sugar composition and glucosylated hydroxylysine contents of several collagens. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 38, 1153-1156.
- Kimura, S., Takema, Y., & Kubota, M. (1981). Octopus skin collagen: Isolation and characterization of collagen comprising two distinct alpha chains. *Journal of Biological Chemistry*, 256(24), 13230-13234.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Shahidi, F. (2010a). Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 119(4), 1519-1526.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89(3), 363-372.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2010b). Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *LWT - Food Science and Technology*, 43(5), 792-800.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2010c). Isolation and properties of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *European Food Research and Technology*, 230(3), 475-483.
- Krimm, S., & Bandekar, J. (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 38, 181-364.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2015). Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 172, 836-843.
- Love, R. M., Yamaguchi, Y., Creach, Y., & Lavety, J. (1976). The connective tissues and collagens of cod during starvation. *Comparative Biochemistry Physiology*, 55B, 487-492.
- Mizuta, S., Yoshinaka, R., Sato, M., & Sakaguchi, M. (1994). Isolation and partial characterization of two distinct types of collagen in the squid *Todarodes pacificus*. *Fisheries Science*, 60(4), 467-471.
- Mizuta, S., Hwang, J-H., & Yoshinaka, R. (2002). Molecular species of collagen from wing muscle of skate (*Raja Kenojei*). *Food Chemistry*, 76, 53-58.
- Mizuta, S., Hwang, J-H., & Yoshinaka, R. (2003). Molecular species of collagen in pectoral fin cartilage of skate (*Raja Kenojei*). *Food Chemistry*, 80, 1-7.
- Montero, P., & Borderias, A. J. (1991). Emulsifying capacity of collagenous material from muscle and skin of hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb) : Effect of pH and NaCl concentration. *Food Chemistry*, 41, 251-267.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Montero, P., Gomez-Guillen, M. C., & Borderias, A. J. (1999). Functional characterization of muscle and skin collagenous material from hake (*Merluccius merluccius* L.). *Food Chemistry*, 65, 55-59.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004a). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 85(1), 81-89.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004b). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 86(3), 325-332.
- Nagai, T., Nagamori, K., Yamashita, E., & Suzuki, N. (2002). Collagen of octopus *Callistoctopus arakawai* arm. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(3), 285-289.
- Nagai, T., Suzuki, N., & Nagashima, T. (2008). Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu. *Food Chemistry*, 111(2), 296-301.
- Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N., & Suzuki, N. (2001). Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry*, 72(4), 425-429.
- Nagai, T., & Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material – skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68, 277-281.
- Nagai, T., Worawattanamateekul, W., Suzuki, N., Nakamura, T., Ito, T., Fujiki, K., Nakao, M., & Yano, T. (2000). Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jelly fish (*Rhopilema asamushi*). *Food Chemistry*, 70, 205-208.
- Nagai, T., Araki, Y., & Suzuki, N. (2002). Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry*, 78, 173-177.
- Nagai, T., & Suzuki, N. (2002). Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. *Food Chemistry*, 76, 149-153.
- Nagarajan, M., Benjakul, S., Prodpran, T., Songtipya, P., & Kishimura, H. (2012). Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 389-397.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., & 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1492-1500.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2011). Characterization of collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) solubilized by albacore tuna pepsin. *King Mongkut's Agro-*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น มิใช่เพื่อการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ยกเว้นที่ได้รับอนุญาตแบบลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & Osako, K. (2011). Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry*, 125(2), 500-507.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2007). Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104(2), 593-601.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2008). Tuna Pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus* spp.). *Journal of Food Science*, 73(5), C413-C419.
- Nishimoto, M., Mizuta, S., & Yoshinaka, R. (2004). Characterization of molecular species of collagen in muscles of Japanese amberjack, *Seriola quinqueradiata*. *Food Chemistry*, 84, 127-132.
- Nomura, Y., Sakai, H., Ishii, Y., & Shirai, K. (1996). Preparation and some properties of type I collagen from fish scales. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60, 2092-2094.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8088-8092.
- Payne, K. J., & Veis, A. (1988). Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers*, 27(11), 1749-1760.
- Piez, K. A., & Gross, J. (1960). The amino acid composition of some fish collagens: The relation between composition and structure. *Journal of Biological Chemistry*, 235(4), 995-998.
- Plepis, A. M. D. G., Goisis, G., & Das-Gupta, D. K. (1996). Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polymer Engineering and Science*, 36(24), 2932-2938.
- Rigby, B. J. (1968). Amino-acid composition and thermal stability of the skin collagen of the Antarctic ice-fish. *Nature*, 219, 166-167.
- Rochdi, A., Foucat, L., & Renou, J. (2000). NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen. *Food Chemistry*, 69, 295-299.
- Sadowska, M., Kolodziejska, I., & Niecikowska, C. (2003). Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81(2), 257-262.
- Saito, M., Kunisaki, N., Urano, N., & Kimura, S. (2002). Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Journal of Food Science*, 67(4), 1319-1322.

Sikorski, Z. E., KolaKoska, A., & Pan, B. S. The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. In: Z.E. Sikorski (ed.). *Seafood: resources, nutritional composition and preservation*.

- Florida: CRC Press.1990, pp. 29-54.
- Sikorski, Z. E., Scott, D. N., & Buisson, D. H. (1984). The role of collagen in the quality and processing of fish. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 20(4), 301-343.
- Sikorski, Z. E., KolaKoska, A., & Pan, B. S. (1990). The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. *In Seafood : resources, nutritional composition and preservation.* (Sikorski, Z. E., ed.). p. 29-54. CRC Press. Florida.
- Sikorski, Z. E., & Borderias, J. A. (1994). Collagen in the muscles and skin of marine animals. *In Seafood Proteins.* (Sikorski, Z. E., Pan, B. S., & Shahidi, F., eds.). p. 58-67. Chapman & Hall. New York.
- Surewicz, W. K., & Mantsh, H. H. (1988). New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochimica et biophysica acta*, 952(2), 115-130.
- Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1980). Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. McGraw-Hill, New York.
- 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*). *Journal of Food Science*, 72(8), E450-E455.
- Wong, D. W. S. (1989). *Mechanism and Theory in Food Chemistry.* New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc.
- Vojdani, F. (1996). Solubility. *In Methods of Testing Protein Functionality.* 1st ed. (Hall, G. M., ed.). p. 11-60. St. Edmundsbury Press. Great Britain.
- Zayas, J. F. (1997). *Functionality of Proteins in Food.* Springer. Berlin.
- Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y., & Wu, X. (2007). Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 103(3), 906-912.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตรวจสอบปริมาณไฮดรอกซีโพรตีน (Nalinanon และคณะ, 2010)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายออกซิเดชัน (oxidant solution)

(a) สารละลายคอลลามีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

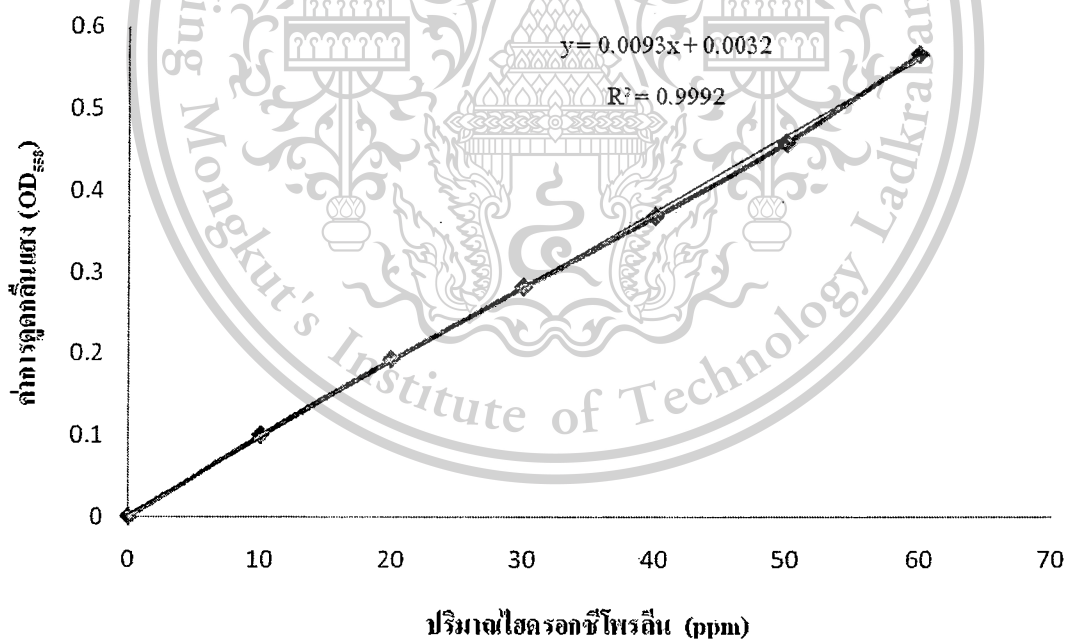
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

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 ทันทที 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 นำค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณไฮดรอกซีโพลีน จากสมการ

กราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณไฮดรอกซีโพลีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

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 สารละลายด่าง

ผสมสารข้อ 1.1.1 ปริมาณ 50 ส่วน โดยปริมาตร กับสารละลายในข้อ 1.1.2 ปริมาณ 1 ส่วน โดยปริมาตร (ผสมก่อนใช้)

1.4 Folin

เจือจางสารละลายจากขวดสำเร็จด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (จาก 2 นอร์มัล เป็น 1 นอร์มัล) สารละลายนี้เป็นสารละลายของโซเดียมทั้งสเตดและโซเดียมโมลิบเดต 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

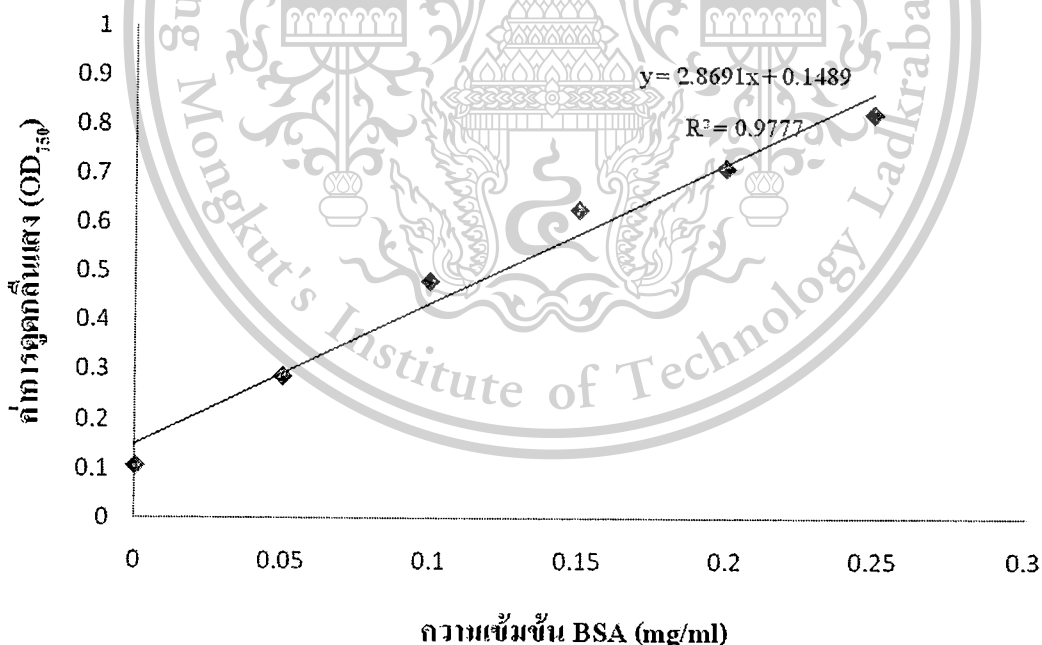
2.1.3 เติมสารละลายด่างหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- 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 ปิเปิดตัวอย่างเจือจาง 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 คำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐานของ BSA



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ BSA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ค

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret (Copeland และคณะ, 1994)

1. วิธีเตรียมสารละลายไบยูเรต

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

2. วิธีวิเคราะห์

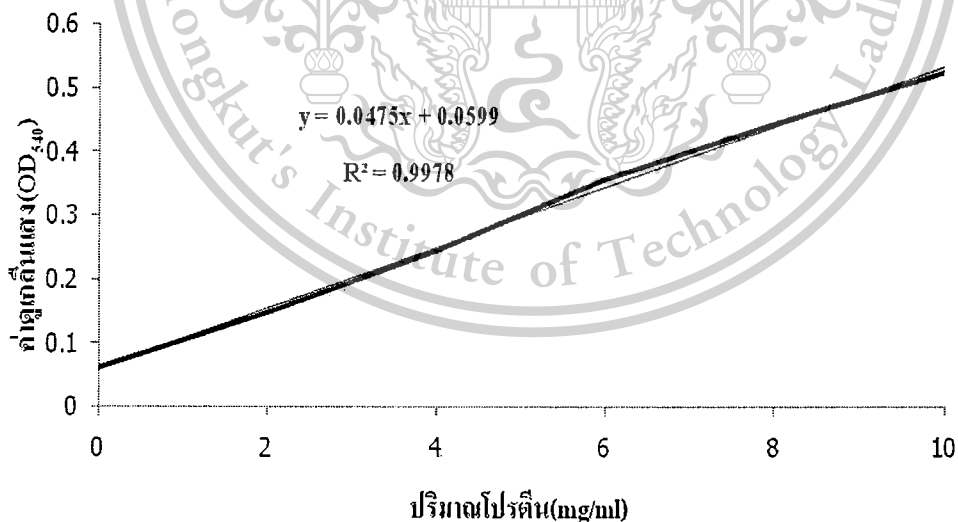
2.1 บีเปิดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นโปรตีนประมาณ 1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500

ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง

2.2 เติมน้ำไบยูเรต รีเอเจนท์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นผสมด้วย Vortexmixer

2.3 ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง ประมาณ 30-45 นาที

2.4 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กำหนดหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐานของ BSA



ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณ โปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ง
 รายละเอียดผลงานวิจัยที่ผลิตได้

2012 International Conference on Nutrition and Food Sciences
 IPCBEE vol. 39 (2012) © (2012) IACSIT Press, Singapore

Partial Characterization of Collagen from Pharaoh Cuttlefish (*Sepia Pharaonis*) Skin

Sithipong Nalinanon^{1*}, Soottawat Benjakul² and Hideki Kishimura³

¹ Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

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

Abstract. Pepsin solubilized collagen (PSC) from the skin of pharaoh cuttlefish was isolated, partially purified by salt precipitation and dialysis prior to characterization. The yield of PSC was 43.7% (dry weight). PSC had good purity which showed the distinct UV absorption peak at 232 nm and high hydroxyproline content. Total sugar content of PSC was 3.40% (dry weight), which was higher than that of collagen from calf skin (CC) (1.45% dry weight) ($P < 0.05$). Based on protein pattern, PSC was considered to contain mixed type collagens, in which consisted of α - and β -chains as major components. PSC was rich in glycine and had high content of amino acids (196 residues/1000 residues). The maximum transition temperature (T_m) of PSC was 34 °C which was about 7 °C lower than that of CC. The skin waste material from cuttlefish processing is one of a promising new source for collagen production.

Keywords: Characterization, Collagen, Extraction, Cuttlefish, *Sepia pharaonis*

1. Introduction

Collagen is a major structural protein in the connective tissue of animal skin and bone. The structural unit of collagen is tropocollagen, a rod-shaped protein consisting of three polypeptides unit (called α -chains) intertwined to form a triple-helical structure [1]. Each polypeptide chain forms a left-handed helix and consists of repeating triplets, (Gly-X-Y)_n, where X and Y are, with a high possibility, proline or hydroxyproline [2]. Generally, collagen has a wide range of applications in cosmetic, biomedical, pharmaceutical, leather and film industries [3, 4].

Currently, the increasing attention of alternative sources for replacement of mammalian collagen has been paid, especially from seafood processing by-products. Pharaoh cuttlefish skin, a by-product from cuttlefish processing, is one of the alternative sources for collagen preparation since mammalian collagens are associated with several problems such as the outbreak of mad cow disease and the constraint for some religions, mainly Islam and Judaism [5]. Generally, typical processing, especially acid solubilization, renders a low yield of collagen. To tackle the problem, pepsin has been applied since it is able to cleave peptides specifically in telopeptide region of collagen, leading to increased extraction efficiency [4, 5]. Therefore, the objectives of this study were to extract collagen from the skin of pharaoh cuttlefish and to characterize the resultant collagen.

2. Materials and Methods

* Corresponding author. Tel.: +66-2329-8000 ext. 7258; Fax: +66-2329-8526.
 E-mail address: kusitthi@kmitl.ac.th; nalinanon@hotmail.com

2.1. Preparation of Skin Collagen

Collagen from the skin of pharaoh cuttlefish was prepared according to the method of Nalinanon et al. [4] with some modifications. All procedures were performed at 4 °C. The skin was cut into small pieces. After non-collagenous protein and fat were removed, the skin sample was lyophilized and kept at -20 °C until used. The lyophilized skin was extracted with 0.5 M acetic acid in presence of pepsin (10g/100g dry sample) for 72 h prior to filtration through 2 layers of cheesecloth. The filtrate was precipitated by the addition of NaCl to a final concentration of 2.6 M in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5). The mixture was allowed to stand for 1 h for pepsin inactivation. The resultant precipitate was collected by centrifuging at 20,000 ×g for 1 h. The pellet was dissolved in 0.5 M acetic acid prior to dialysis against 0.1 M acetic acid and distilled water, respectively. The dialysate was lyophilized and referred to as "pepsin solubilized collagen" (PSC). PSC was subjected to the determination of hydroxyproline content [4]. The yield of collagen extraction was calculated based on weight of lyophilized collagen in comparison with that of lyophilized skin.

2.2. Characterization of Skin Collagen

2.2.1. SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was performed by the method of Laemmli [6]. Samples (15 µg protein) were loaded onto a polyacrylamide gel made of 7.5% separating gel and 4% stacking gel and subjected to electrophoresis using a Mini-PROTEAN II unit. After electrophoresis, gel was stained by 0.05% (w/v) Coomassie Blue R-250 in 15% (v/v) methanol and 5% (v/v) acetic acid for 3 h prior to destain to remove the dark background. High-molecular-weight protein markers were used to estimate the molecular weight of proteins.

2.2.2. Amino Acid Analysis

Collagen was hydrolysed under reduced pressure in 4.0 M methanesulfonic acid containing 0.2% (v/v) 3-(2-aminoethyl)indole at 115 °C for 24 h. The hydrolysates were neutralised with 3.5 M NaOH and diluted with 0.2 M citrate buffer (pH 2.2). An aliquot of 0.4 mL was applied to an amino acid analyser (MLC-703; Atto Co., Tokyo, Japan).

2.2.3. Hydroxyproline Content

Collagen was dehydrated with acetone and then hydrolysed in 6 M HCl at 110 °C for 24 h prior to determination of hydroxyproline content using the colorimetric method as described by Nalinanon et al. [4]. The hydroxyproline content was calculated and expressed as mg/g of dried collagen sample.

2.2.4. Total Sugar Content

Total carbohydrate content of collagen was determined according to the phenol-sulfuric method as described by Fournier [7] with a slight modification. To calculate the concentration of sugar presented in the sample, calibration curve was performed using D-glucose as a standard. Total sugar content was calculated and expressed as % dry weight of collagen sample.

2.2.5. UV Absorption Measurement

UV absorption spectrum of collagen dissolved in 0.5 M acetic acid (1 mg/mL) was measured using a spectrophotometer according to the method of Nalinanon et al. [8]. Prior to measurement, the base line was set with 0.5 M acetic acid. The spectrum was obtained by scanning the wavelength in the range of 190–350 nm with a scan speed of 50 nm/min at room temperature.

2.2.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC analysis of collagen samples was carried out following the methods of Nalinanon et al. [4] with a slight modification. The samples were rehydrated by adding 0.05 M acetic acid to dried samples at a solid/solution ratio of 1:40 (w/v) for 2 days at 4 °C. DSC analysis was performed using a differential scanning calorimeter (Model DSC 7, Norwalk, CT, USA). The collagen solutions (5–10 mg) were accurately weighed into aluminium pans and sealed. The samples were scanned at 1 °C/min over the range of 20–50 °C using iced water as the cooling medium. An empty pan was used as the reference. The maximum transition temperature (T_m) and total denaturation enthalpy (ΔH) were estimated from the DSC thermogram.

3. Results and Discussion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3.1. Yield and Some Characteristics of Skin Collagen

The yield and some characteristics of PSC isolated from the skin of pharaoh cuttlefish is shown in Table 1. As per our preliminary study, the yield of acid-solubilized collagen (ASC) was negligible when 0.5 M acetic acid was only used as extracting solution (data not shown). Pepsin was further used as the aid for collagen extraction. The yield of resultant collagen (PSC) was 43.7% (dry weight). Hydroxyproline content of PSC and CC was 113 and 104 mg/g dry sample, respectively. From UV absorption spectra of both PSC and CC, an absorbance at 232 nm with the highest intensity was observed with no absorption peak at 280 nm (data not shown). The results indicated high efficacy of non-collagenous protein removal in PSC preparation. PSC had higher total sugar content than CC ($P < 0.05$). The hydroxylysine-linked carbohydrates may have an impact on the structure of the fibrils in the invertebrate collagen [9].

Table 1: Yield, hydroxyproline content, total sugar content and UV absorption peak of pepsin-solubilized collagen (PSC) from pharaoh cuttlefish skin and type I collagen from calf skin (CC).[†]

	PSC	CC
Yield (% dry weight)	43.7 ± 0.90	-
Hydroxyproline content (mg/g dry sample)	113 ± 6.18b [‡]	104 ± 2.45a
Total sugar content (% dry weight)	3.40 ± 0.17b	1.45 ± 0.20a
UV absorption peak (nm)	232 ± 0.05a	232 ± 0.13a

[†] Mean ± SD from triplicate determinations.

[‡] Different letters in the same row indicate the significant difference ($P < 0.05$).

3.2. Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein patterns of collagens under reducing condition are shown in Fig. 1. Differences in protein patterns of different collagens were observed. The result revealed that PSC comprised β and α chains as the major constituents. With respect to PSC, it possibly contained both $(\alpha 1)_3$ homotrimer and $(\alpha 1)_2\alpha 2$ or $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ heterotrimer.

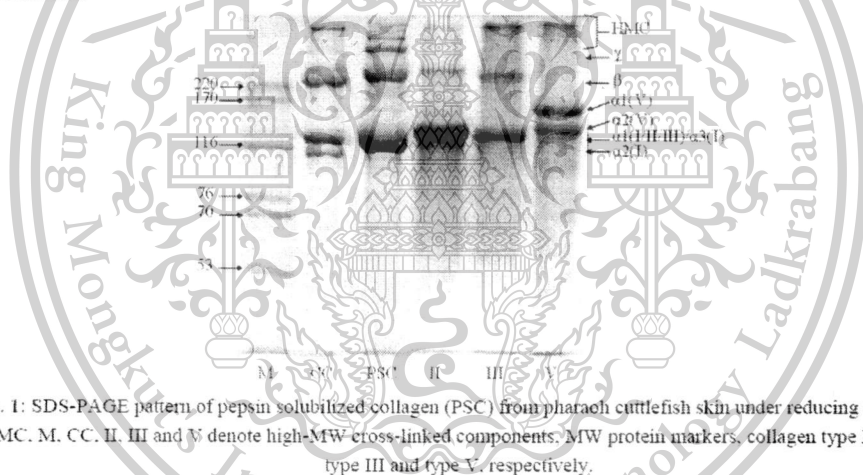


Fig. 1: SDS-PAGE pattern of pepsin solubilized collagen (PSC) from pharaoh cuttlefish skin under reducing condition. HMC, M, CC, II, III and V denote high-MW cross-linked components, MW protein markers, collagen type I, type II, type III and type V, respectively.

3.3. Amino Acid Composition

The amino acid composition, expressed as residues per 1000 total residues, is shown in Table 2. This shows that glycine was the most abundant amino acid in both collagens. PSC had relatively high contents of proline, hydroxyproline and alanine, decreasing in that order. The value of imino acids (proline and hydroxyproline) found in PSC and CC was 196 and 215 residues, respectively.

3.4. Thermal Stability

DSC thermogram of PSC and CC rehydrated in 0.05 M acetic acid are shown in Fig. 2. The maximum transition temperature (T_m) and total denaturation enthalpy (ΔH) of PSC was 34.0 °C and 1.164 J/g,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

respectively, which were lower than that of CC ($T_m = 40.7^\circ\text{C}$; $\Delta H = 1.204\text{ J/g}$). This might be owing to the lower content of imino acids (hydroxyproline and proline) of collagen from the skin of pharaoh cuttlefish. The differences in denaturation temperature of collagen from different sources might be determined by different contents of imino acids (proline and hydroxyproline) [2, 3]. Imino acid content shows a direct positive correlation with the thermal stability of protein via the formation of hydrogen bonds, through the hydroxyl group of hydroxyproline [3, 10, 11].

Table 2: Amino acid composition of pepsin solubilized collagen (PSC) from pharaoh cuttlefish skin and type I collagen from calf skin (CC).

Amino acid	PSC	CC
Alanine	83	119
Arginine	60	51
Aspartic acid/asparagine	59	45
Cysteine	0	0
Glutamic acid/glutamine	82	75
Glycine	331	330
Histidine	7	5
Isoleucine	20	11
Leucine	26	23
Lysine	12	26
Hydroxylysine	14	7
Methionine	15	6
Phenylalanine	10	3
Hydroxyproline	96	94
Proline	100	121
Serine	40	39
Threonine	23	18
Tyrosine	4	3
Tryptophan	1	3
Valine	18	21
Total	1000	1000
Imino acids*	196	215

* Imino acids include proline and hydroxyproline

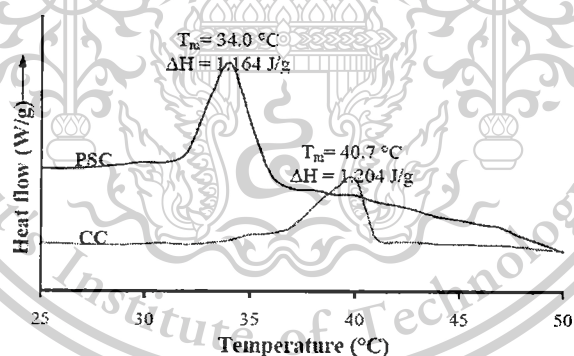


Fig. 2: DSC thermograms of pepsin solubilized collagen (PSC) from pharaoh cuttlefish skin and type I collagen from calf skin (CC) rehydrated in 0.05 M acetic acid.

4. Conclusion

Extraction of collagen from the skin of pharaoh cuttlefish could be achieved by pepsin solubilization under acidic condition. PSC from pharaoh cuttlefish was characterized biochemically and physicochemically.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

It contained mixed type collagens that α - and β -chains were the major components. PSC presented high imino acid content (196 residues/1000 residues) and transition temperature (34 °C).

5. Acknowledgements

This work was financially supported by Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. The authors would like to thank Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Japan for amino acid composition analysis.

6. References

- [1] S. Nalinanon, S. Benjakul, H. Kishimura, and K. Osako. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chem.* 2011, **125** (2): 500-507.
- [2] M. Ogawa, M.W. Moody, R.J. Portier, J. Bell, M.A. Schexnayder, and J.N. Losso. Biochemical properties of black drum and sheephead seabream skin collagen. *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51** (27): 8088-8092.
- [3] A. Jongjareonrak, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, and M. Tanaka. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chem.* 2005, **93** (3): 475-484.
- [4] S. Nalinanon, S. Benjakul, W. Visessanguan, and H. Kishimura. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* 2007, **104** (2): 593-601.
- [5] S. Nalinanon, S. Benjakul, W. Visessanguan, and H. Kishimura. Tuna Pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus* spp.). *J. Food Sci.* 2008, **73** (5): C413-C419.
- [6] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (5259): 680-685.
- [7] E. Fournier. (2005). Basic protocol: Determination of reducing and nonreducing sugars using the phenol-sulfuric acid assay. In: R.E. Wrolstad et al. (eds.), *Handbook of food analytical chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2005. pp. 653-655.
- [8] S. Nalinanon, S. Benjakul, and H. Kishimura. 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.* 2010, **90** (9): 1492-1500.
- [9] Z.E. Sikorski, A. KolaKoska, and B.S. Pan. The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. In: Z.E. Sikorski (ed.). *Seafood : resources, nutritional composition and preservation*. Florida: CRC Press. 1990. pp. 29-54.
- [10] Z.E. Sikorski, D.N. Scott, and D.H. Butts. The role of collagen in the quality and processing of fish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1984, **20** (4): 301-343.
- [11] Y. Zhang, W. Liu, G. Li, B. Shi, Y. Miao, and X. Wu. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chem.* 2007, **103** (3): 906-912.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



Address: Room5, 6/F., Shun On Commercial Building, 112-114 Des Voeux Road, Central, Hong Kong, Email: admin@cbees.org
Tel: 00852-30697291

Notification of Acceptance of the ICNFS 2012

July 23 – 24, 2012, Singapore

<http://www.icnfs.org>



ISI Proceedings™

Paper ID : N017

Paper Title : Partial characterization of collagen from pharaoh cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin

Dear Sithipong Nalinanon, Soottawat Benjakul and Hideki Kishimura,

First of all, thank you for your concern. 2012 International Conference on Nutrition and Food Sciences -ICNFS 2012 review procedure has been finished. We are delighted to inform you that your manuscript has been accepted for presentation at 2012 International Conference on Nutrition and Food Sciences -ICNFS 2012, Singapore. Your paper was tripling blind-reviewed and, based on the evaluations. The reviewers' comments are enclosed.

The conference received papers from about 20 different countries and regions during the submission period. And there are about 80 papers accepted by our reviewers who are the international experts from all over the world. The selected papers could be published in our conference proceeding with high quality. According to the recommendations from reviewers and technical program committees, we are glad to inform you that your paper identified above have been selected for publication and oral presentation. You are invited to present your paper and studies during our ICNFS 2012 conference that would be held on 23-24, July, 2012, Singapore.

The ICNFS 2012 is co-sponsored by Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society (APCBEES)

All papers of ICNFS 2012 will be published in the conference proceeding, and will be indexed by INSPEC and Thomson ISI/EBSCO and CNKI (中国知网).

(Important Steps for your registration): Please do finish all the 6 steps on time to guarantee the paper published in the proceeding successfully:

1. Revise your paper according to the Review Comments in the attachment carefully. (Five authors at most each paper)

2. Format your paper according to the Template carefully.

<http://www.icnfs.org/CBEES.template.doc> (DOC Format)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1 -

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



Address: Room5, 6/F., Shun On Commercial Building, 112-114 Des Voeux Road, Central, Hong Kong, Email: admin@cbees.org
Tel: 00852-30697291

3. Download and complete the Registration Form.

<http://www.icnfs.org/reg.doc> (English)

4. Finish the payment of Registration fee by Credit Card. (The information can be found in the Registration form)

<http://www.icnfs.org/reg.doc> (English)

5. Finish the Copyright Form

<http://www.icnfs.org/copyright.doc>

6. Send your final papers (both .doc and .pdf format), filled registration form (.doc format), copyright form (.jpg format) and the scanned payment (in .jpg format) to us at icnfs@cbees.org. (Before April 20, 2012) (Very important)

ICNFS 2012 will check the format of all the registered papers first. so the authors don't need to upload the paper to the system. After the registration, we will send all qualified papers to the publish house and index organization for publishing directly.

We are looking forward to meet all the authors in our conference. But if you and your co-author(s) could not attend ICNFS 2012 to present your paper for some reasons. please inform us. And we will send you the official receipt of registration fee, proceedings and/or other materials after ICNFS 2012 free of charge.

Please strictly adhere to the format specified in the conference template while preparing your final paper. If you have any problem, please feel free to contact us via icnfs@cbees.org. For the most updated information on the conference, please check the conference website at <http://www.icnfs.org>. The Conference Program will be available at the website in Late June, 2012.

Again, congratulations. I look forward to seeing you in Singapore.

Yours sincerely,

ICNFS 2012 Organizing Committees



<http://www.icnfs.org/>

ICNFS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก จ
สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย

1. รายละเอียดงบประมาณที่เสนอขอ

รายละเอียดงบประมาณที่เสนอขอ

1. ค่าตอบแทน	18,000 บาท
2. ค่าใช้สอย	40,000 บาท
3. ค่าวัสดุ	40,000 บาท
4. ค่าสาธารณูปโภค	2,000 บาท

รวม 100,000 บาท

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.
ค่าตอบแทน				3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000			
ค่าใช้สอย			5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000		
ค่าวัสดุ		5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	4,000	2,000	2,000	2,000	
ค่าสาธารณูปโภค					1,000			1,000				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายสิทธิพงษ์ นลินานนท์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Sitthipong Nalinanon

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ และผู้ช่วยคณบดี คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัติการศึกษา

ระดับ	สถานศึกษา	ประเทศ	ปีที่จบ	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., Klomkloa, 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- 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., Fukumori, 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- **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.**, Maksutthipan, 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.