

ไบโอแคสเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึงสยาม
(*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*)
: การผลิต กิจกรรมการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์บราวน์กรอบ



ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

ไบโอแคสซียมจากกระดูกปลาทูกผสมบีกสยาม
(*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*)
: การผลิต กิจกรรมการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์บราวน์กรอบ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สำนักบริหารและพัฒนาระบบบริหาร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาอุกผสมบิกสยาม
(*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*)
: การผลิต กิจกรรมการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์บราวน์กรอบ

เจนจิรา นิเวศน์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล แสนพันธุ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน

อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	ไบโอแคลเซียมจากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยาม (<i>Pangasianodon gigas</i> × <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>) : การผลิต กิจกรรมการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์บราวนี่กรอบ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวเจนจิรา นิเวศน์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล เสนพันธ์

บทคัดย่อ

ไบโอแคลเซียมจากกระดุกปลาเป็นผลิตภัณฑ์แคลเซียมชนิดอินทรีย์ที่มีคุณภาพสูง วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อพัฒนากรรมวิธีการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยาม (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) 4 ขั้นตอน ประกอบด้วย 1) กระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูง 2) กระบวนการแช่ในสารละลายต่าง 3) กระบวนการแช่ในตัวทำละลายเอทานอล 4) กระบวนการฟอกสีและบดให้เป็นผงไบโอแคลเซียม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ ร้อยละผลผลิต องค์ประกอบทางเคมี ค่าสี ปริมาณแร่ธาตุ ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน รูปแบบของโปรตีน องค์ประกอบของกรดอะมิโน การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ โครงสร้างทางผลึก หมู่ฟังก์ชัน และโครงสร้างทางจุลภาคของกระดุกปลาจาก 4 กระบวนการ พบว่าไบโอแคลเซียมที่ได้มีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 14.46 นอกจากนี้ ไบโอแคลเซียมมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และความชื้นลดลง แต่กลับมีปริมาณเถ้า และค่าความสว่าง (L^*) เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ไบโอแคลเซียมยังอุดมไปด้วยแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัส ซึ่งไม่พบว่ามีสารปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น พรอท ตะกั่ว สารหนู อีกทั้งยังพบว่าไบโอแคลเซียมมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนสูงถึง 30.82 ± 1.83 มิลลิกรัม/กรัม ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของกระดุกปลาจาก 4 กระบวนการด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบแถบโปรตีนหลัก 2 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 133 และ 116 กิโลดาลตัน ไบโอแคลเซียมยังอุดมไปด้วยกรดอะมิโน โกลซีน โพรลีน อะลานีน กรดกลูตามิก และกรดแอสพาทิก อย่างไรก็ตามกระบวนการแช่กระดุกปลาในตัวทำละลายเอทานอลและฟอกสี แล้วบดให้เป็นผงไบโอแคลเซียมทำให้มีค่า Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) และมีปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ลดลงอย่างมาก ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการก่อนหน้า เมื่อศึกษาโครงสร้างทางผลึกของไบโอแคลเซียมด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD) และหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าไบโอแคลเซียมมีรูปแบบผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)

และผงไบโอแคลเซียมที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็กขนาด 2-10 ไมโครเมตร กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นกระบวนการข้างต้นมีความเหมาะสมที่จะทำให้ได้มาซึ่งไบโอแคลเซียมที่มีคุณภาพดี เป็นผงละเอียด มีสีขาวบริสุทธิ์ ปราศจากกลิ่นเหม็นหืน และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมแคลเซียมได้

การศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะของผงไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบ องค์ประกอบทางเคมี ค่าสี ปริมาณไฮดรอกซี โพรลีน ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียม และโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา พบว่าผงไบโอแคลเซียมมีโปรตีน ค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีเหลือง (b^*) ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนสูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์และแคลเซียมทางการค้า ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามแคลเซียมอนินทรีย์มีปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้น้อยกว่าไบโอแคลเซียม นอกจากนี้แคลเซียมอนินทรีย์ยังมีกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH^{*} และ ABTS^{*} สูงกว่าไบโอแคลเซียมและแคลเซียมทางการค้า แต่ไบโอแคลเซียมมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) สูงกว่าแคลเซียมทางการค้าและแคลเซียมอนินทรีย์ ส่วนแคลเซียมทางการค้ามีค่าความสามารถในการจับโลหะ (Fe^{2+}) สูงที่สุด เมื่อวิเคราะห์ค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง พบว่าไบโอแคลเซียมมีค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมสูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์และแคลเซียมทางการค้า ($p \leq 0.05$) และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาพบว่าผงไบโอแคลเซียมที่มีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็กขนาด 5-10 ไมโครเมตร กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นไบโอแคลเซียมเป็นแคลเซียมอนินทรีย์ที่อุดมไปด้วยคอลลาเจน และเปปไทด์ ที่มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน และค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมสูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์ และแคลเซียมทางการค้า

จากการพัฒนาสูตรและวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามชนิดบรรจุแคปซูล เพื่อต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์แคลเซียมทางการค้าด้วยการนำไบโอแคลเซียมมาเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตและแคลเซียมแอสคอร์เบต ประกอบด้วย สูตรที่ 1 ผงไบโอแคลเซียม (Bio-Ca) สูตรที่ 2 ผงไบโอแคลเซียมผสมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Bio-Ca + Col) สูตรที่ 3 ผงไบโอแคลเซียมผสมแคลเซียมแอสคอร์เบต (Bio-Ca + Vit C) และสูตรที่ 4 ผงไบโอแคลเซียมผสมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตและแคลเซียมแอสคอร์เบต (Bio-Ca + Col + Vit C) โดยนำผงไบโอแคลเซียม ทั้ง 4 สูตรมาวิเคราะห์คุณภาพ ได้แก่ ค่าสี ค่าปริมาณร้อยละของความชื้น ค่าวอเตอร์แอกติวิตี (a_w) ค่าความหนาแน่นรวม ค่าความหนาแน่นจำเพาะ ค่าร้อยละของการละลาย กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียม พบว่า ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 4 (Bio-Ca

+ Col + Vit C) มีค่าความสว่าง (L^*) สูงที่สุด นอกจากนี้ ไบโอบีโกลูโคสทุกสูตรมีค่าปริมาณร้อยละของความชื้น และค่าวอเตอร์แอกติวิตีไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามไบโอบีโกลูโคสบรรจุแคปซูลสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีค่าความหนาแน่นรวมสูงที่สุด ขณะที่ไบโอบีโกลูโคสบรรจุแคปซูลสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) มีค่าความหนาแน่นจำเพาะต่ำที่สุด เมื่อพิจารณาถึงค่าการละลายของไบโอบีโกลูโคสที่ค่าพีเอชต่าง ๆ พบว่าไบโอบีโกลูโคสทุกสูตรมีค่าการละลายสูงสุดในช่วงพีเอช 1-2 นอกจากนี้ไบโอบีโกลูโคสบรรจุแคปซูลที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) ยังมีค่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH^{*} และ ABTS^{*} ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) และค่าความสามารถในการจับโลหะ (Fe^{2+}) สูงกว่าสูตรอื่น ๆ อีกทั้งไบโอบีโกลูโคสสูตรที่ 1 (Bio-Ca) และสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมสูงกว่าไบโอบีโกลูโคสบรรจุแคปซูลสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) และ สูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) ดังนั้นการเสริมคอลาเจนไฮโดรไลเซตและแคลเซียมแอสคอร์เบตในไบโอบีโกลูโคสจะส่งผลทำให้ไบโอบีโกลูโคสที่ได้มีการละลายที่ดีขึ้น มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน และค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมสูงขึ้น

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอบีโกลูโคสจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามโดยเสริมผงไบโอบีโกลูโคสที่ระดับร้อยละ 0, 10, 20, และ 30 ของน้ำหนักแป้ง และศึกษาลักษณะทางกายภาพ ค่าสี ปริมาณความชื้น ค่าวอเตอร์แอกติวิตี (a_w) คุณภาพทางด้านเนื้อสัมผัสและการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัส ผลการทดลองพบว่าขนมบราวนี่กรอบที่เสริมผงไบโอบีโกลูโคสในระดับที่สูงขึ้น ทำให้มีรูพรุนขนาดเล็กในผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพ พบว่าขนมบราวนี่กรอบที่เสริมผงไบโอบีโกลูโคสที่ระดับต่าง ๆ มีค่าความสว่าง (L^*) สูงขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของผงไบโอบีโกลูโคสในปริมาณที่สูงขึ้น ($p \leq 0.05$) ส่วนความชื้นของขนมบราวนี่กรอบทุกสูตรไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่ค่าวอเตอร์แอกติวิตี (a_w) ของขนมบราวนี่กรอบเสริมผงไบโอบีโกลูโคสที่ระดับร้อยละ 20 และ 30 สูงกว่าบราวนี่กรอบสูตรควบคุม (ไม่มีผงไบโอบีโกลูโคส) และขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอบีโกลูโคสร้อยละ 10 ($p \leq 0.05$) ขนมบราวนี่กรอบเสริมผงไบโอบีโกลูโคสที่ระดับร้อยละ 10 จะส่งผลต่อคุณภาพทางด้านเนื้อสัมผัสโดยจะทำให้มีความเปราะมากขึ้นเมื่อเทียบกับสูตรควบคุม ($p \leq 0.05$) อีกทั้งยังได้รับคะแนนการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสสูงกว่าสูตรอื่น ($p \leq 0.05$) ดังนั้นขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอบีโกลูโคสจึงเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพอีกทางเลือกสำหรับผู้บริโภคในการรับประทานอาหารเสริมแคลเซียม

คำสำคัญ : กระดูกปลา, กระบวนการ, ไบโอบีโกลูโคส, ปลาน้ำจืดลูกผสม, กิจกรรมการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ



Title	BIO-CALCIUM FROM HYBRID CATFISH BUK SIAM (<i>Pangasianodon gigas</i> × <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>) BONE : PRODUCTION, BIOACTIVITY AND APPLICATION IN CRISPY BROWNIES
Author	Miss Jenjira Niwet
Degree	Master of Science in Food Science and Technology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Theeraphol Senphan

ABSTRACT

Bio-calcium from fish bones is a high quality of organic calcium product. The objective of this research was to develop a process for bio-calcium production from hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) bone including 4 steps: 1) high pressure water jet process 2) soaking in alkaline solution 3) ethanol immersion process 4) bleaching and grinding to obtain bio-calcium powder. %Yield, chemical composition, color values, mineral contents, hydroxyproline contents, protein pattern, amino acid composition, lipid oxidation, total volatile acids, X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) techniques and the microstructure of fish bone from different processes were analyzed. It was found that the obtained bio-calcium had yield of 14.46%. In addition, bio-calcium had a low protein, fat and moisture contents with coincidental increases of ash content and the lightness values (L^*) ($p \leq 0.05$). Bio-calcium was rich in calcium and phosphorus content, while heavy metals (Pb, Hg and As) were not detected. Bio-calcium contained a high hydroxyproline content of 30.82 ± 1.83 mg/g samples. When analyzing the protein pattern of fish bone from 4 processes using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technic, two major protein bands with a molecular weight of 133 and 116 kDa were found. Moreover, bio-calcium was also rich in amino acid contents of glycine,

proline, alanine, glutamic and aspartic acids. However, the process of ethanol immersion, bleaching and grinding to obtain bio-calcium powder decreased in Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) values and total volatile acids ($p \leq 0.05$), compared to the previous process. When studying the structure of bio-calcium using X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) techniques showed that bio-calcium had the crystalline structure of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). The particle sizes of bio-calcium powder were in a range of 2-10 μm and distributed uniformly. Therefore, bio-calcium production was suitable process to obtain a good quality bio-calcium of fine powder, white color, without fishy and rancid odor. It can be developed as a calcium supplement.

Comparative study of calcium powder from bio-calcium, calcined calcium of hybrid catfish bone and commercial calcium were characterized and analyzed of chemical composition, color value, hydroxyproline content, total volatile compounds, antioxidant activity, bioavailability and the structure property. It was found that bio-calcium powder had higher in protein content, lightness value (L^*), yellow value (b^*), hydroxyproline content than calcined calcium and commercial calcium ($p \leq 0.05$). However, calcined calcium had lower volatile compounds than bio-calcium. In addition, calcined calcium had a higher in DPPH $^{\bullet}$ and ABTS $^{\bullet}$ scavenging activities than bio-calcium and commercial calcium but bio-calcium had a higher ferric reducing capacity (FRAP) than commercial calcium and calcined calcium. Commercial calcium had the highest metal chelating activity (Fe^{2+}). When analyzing the calcium bioavailability of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion system, bio-calcium had higher calcium bioavailability than calcined calcium and commercial calcium ($p \leq 0.05$). The particle sizes of bio-calcium powder were in a range of 5-10 μm and distributed uniformly. Therefore, bio-calcium, an organic calcium combined with collagen and peptide, had higher in antioxidant activity and calcium bioavailability than calcined calcium and commercial calcium.

Formulation development and quality analysis of bio-calcium products from the hybrid catfish bone containing capsule to be developed as a commercial

bio-calcium product. Bio-calcium was supplemented with collagen hydrolysate and calcium ascorbate including: formula 1) bio-calcium powder (Bio-Ca) formula 2) bio-calcium powder mixed with collagen hydrolysate (Bio-Ca + Col) formula 3) bio-calcium powder mixed with calcium ascorbate (Bio-Ca + Vit C) and formula 4) bio-calcium powder with collagen hydrolysate and calcium ascorbate (Bio-Ca + Col + Vit C). The results showed that formula 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) had the highest lightness value (L^*). In addition, all formulas were not different in the moisture content and water activity ($p>0.05$). However, formula 3 (Bio-Ca + Vit C) had the highest bulk density, while formula 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) had the lowest tapped density. For the solubility of bio-calcium at various pH values, all formulas of bio-calcium had the highest solubility in the pH ranges of 1-2. In addition, formula 3 (Bio-Ca + Vit C) also had a higher in the DPPH^{*} and ABTS^{*} radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and metal chelating activity (Fe^{2+}) than other formulas. Moreover, formula 1 (Bio-Ca) and formula 3 (Bio-Ca + Vit C) had a higher calcium bioavailability value than formula 2 (Bio-Ca + Col) and formula 4 (Bio-Ca + Col + Vit C). Therefore, bio-calcium supplemented with collagen hydrolysate and calcium ascorbate results in better calcium dissolving. In addition, it has a high antioxidant activity and high calcium bioavailability.

The development of crispy brownie products supplemented with bio-calcium powder at different levels of 0, 10, 20, and 30 % were analyzed of color values, moisture content, water activity (a_w) texture property and sensory evaluation. The results showed that the crispy brownies supplemented with bio-calcium powder at higher levels had more porosity in the product. For the physical characteristics, the lightness values (L^*) of crispy brownies increased with increasing in the content of bio-calcium powder ($p\leq 0.05$). The moisture contents of all crispy brownies were not different ($p>0.05$). Water activity (a_w) of the crispy brownies supplemented with bio-calcium powder at the levels of 20% and 30% had higher than those control sample (without bio-calcium powder) and 10% bio-calcium addition ($p\leq 0.05$). Brownies supplemented with bio-calcium affected on the texture quality, which was more brittle compared to the control brownies ($p\leq 0.05$). It also

had a higher sensory acceptance score than the other formulas ($p \leq 0.05$). Therefore, brownies supplemented with bio-calcium is an alternative healthy product for consumers.

Keywords : Bio Calcium, Process, Fish bone, Hybrid catfish, Bioactivity



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อีระพล แสนพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รวมถึงรองศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา แดงปรก และศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ เม่งอำพัน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อีกทั้งประธานคณะกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธาสินี ญาณภักดี ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์เรื่อง ไบโอดีเซลเชื่อมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยาม (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) : การผลิต กิจกรรมการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์บราวนี่กรอบฉบับนี้ จนการทำวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณแหล่งทุนให้การสนับสนุนงานวิจัย โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) 2/2561 ของสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) รหัสโครงการ 6122049 สัญญาเลขที่ MSD62I0062 ขอขอบคุณทุนกักกฏิ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีการศึกษา 2561

ขอขอบพระคุณบริษัท ไลฟ์ ฟาร์ม แลนด์ ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัย อีกทั้งสนับสนุนวัตถุดิบ วัสดุอุปกรณ์ ตลอดจนความร่วมมือในการเตรียมวัตถุดิบสำหรับการวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนการประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์

ขอขอบพระคุณสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านบริการสังคมปลาบิกและปลาลูกผสมบิกสยามแม่โจ้ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านสถานที่ในการดำเนินการทดลองจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ อาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำตลอดจนความช่วยเหลือต่าง ๆ ด้านการวิจัย เทคนิค การวิเคราะห์ต่าง ๆ ตลอดมา ตลอดจนครอบครัว พ่อแม่ ญาติพี่น้อง ที่ช่วยสนับสนุน เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือที่ดีตลอดมา

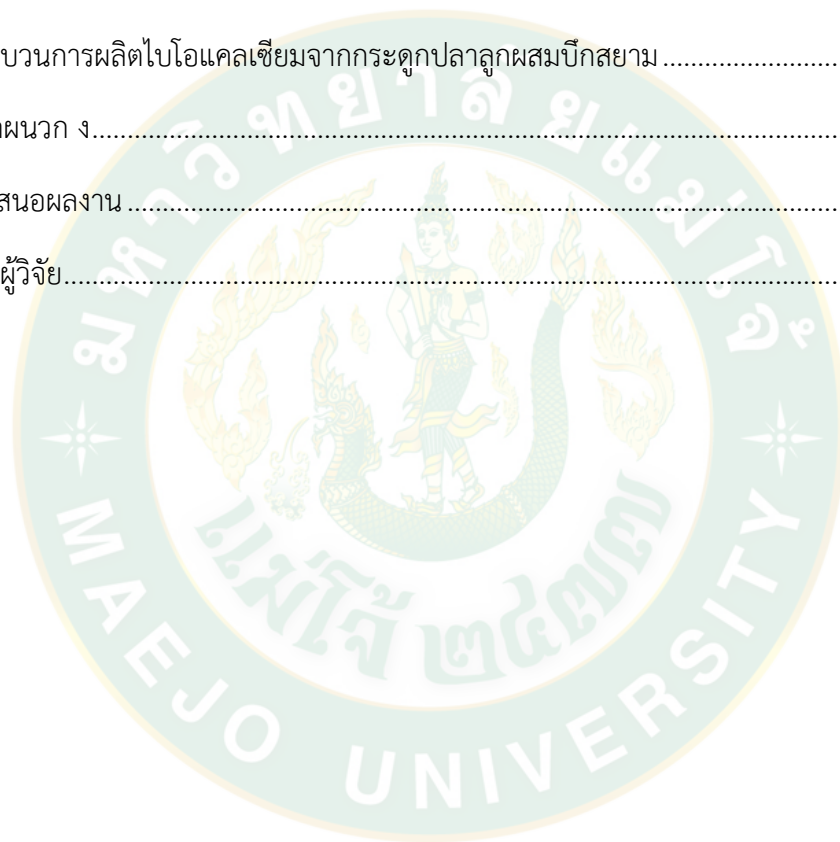
เจนจิรา นิเวศน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ช
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ด
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2	5
การตรวจเอกสาร.....	5
2.1 ปลูกน้ำจืดในประเทศไทย.....	5
2.2 วัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลา.....	8
2.3 แคลเซียม.....	9
2.4 แคลเซียมที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี.....	20
2.5 ไบโอบีโอสแคลเซียม.....	21
2.6 คอลลาเจน.....	24
2.7 การประยุกต์ใช้แคลเซียมในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	27
2.8 บรรานี้.....	29

บทที่ 3	31
วิธีดำเนินการวิจัย	31
วัตถุใดบ	31
เครื่องมือ	31
ตอนที่ 1 การพัฒนากระบวนการผลิตและคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมกระดูกจากปลาลูกผสม บึกสยาม	32
ตอนที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะของไบโอแคลเซียม และแคลเซียมอนินทรีย์จาก กระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม	40
ตอนที่ 3 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามชนิดบรรจุ แคปซูล	44
ตอนที่ 4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ขมบรวานี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม	46
บทที่ 4	49
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	49
ตอนที่ 1 การพัฒนากระบวนการผลิตและคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสม บึกสยาม	49
ตอนที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูก ปลาลูกผสมบึกสยาม และแคลเซียมทางการค้า	72
ตอนที่ 3 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามชนิดบรรจุ แคปซูล	84
ตอนที่ 4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ขมบรวานี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึก สยาม	95
บทที่ 5	100
สรุปผลการวิจัย	100
สรุปผลการวิจัย	100
ข้อเสนอแนะ	100
บรรณานุกรม	102

ภาคผนวก.....	117
ภาคผนวก ก.....	118
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	118
ภาคผนวก ข.....	124
การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ.....	124
ภาคผนวก ค.....	132
กระบวนการผลิตไบโอแคสเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึงสยาม.....	132
ภาคผนวก ง.....	135
นำเสนอผลงาน.....	135
ประวัติผู้วิจัย.....	159



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลักษณะเด่นของปลาบึก ปลาสวาย ปลาบึกลูกผสม และปลาลูกผสมบึกสยามแม่โจ้	7
ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ซากจากการแปรรูปจากกลุ่มปลาหนึ่งน้ำจืดชนิดต่าง ๆ	9
ตารางที่ 3 ความสามารถในการละลายของแคลเซียมในรูปไฮดรอกซีอะพาไทต์ และฟลูออโรอะพาไทต์ ในสารละลายกรดที่ค่าพีเอชต่างกัน	14
ตารางที่ 4 ส่วนผสมของไปโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล	44
ตารางที่ 5 ร้อยละผลผลิตกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จน ได้เป็นผงไปโอแคลเซียม	50
ตารางที่ 6 ค่าสีของกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็น ผงไปโอแคลเซียม	52
ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอน ต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม	54
ตารางที่ 8 ปริมาณแร่ธาตุและโลหะหนักชนิดต่าง ๆ ของกระดูกปลาสด และผงไปโอแคลเซียมจาก กระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม	56
ตารางที่ 9 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกปลาสด และผงไปโอ แคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม	61
ตารางที่ 10 ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ของกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามในระหว่าง กระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม	65
ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีของไปโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบึก สยาม และแคลเซียมทางการค้า.....	73
ตารางที่ 12 ค่าสีของไปโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม และ แคลเซียมทางการค้า.....	74
ตารางที่ 13 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของไปโอแคลเซียมของไปโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จาก กระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม และแคลเซียมทางการค้า.....	75

ตารางที่ 14 ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ของไบโอแคลเซียม และแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม.....	77
ตารางที่ 15 การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียม (Calcium bioavailability) ในระบบจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลองของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า.....	82
ตารางที่ 16 ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ	84
ตารางที่ 17 ค่าสีของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ	85
ตารางที่ 18 ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w) ของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ	86
ตารางที่ 19 การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหารของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมชนิดบรรจุแคปซูลทั้ง 4 สูตร.....	94
ตารางที่ 20 ค่าสีของขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามที่ระดับต่าง ๆ.....	96
ตารางที่ 21 ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ของขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามที่ระดับต่าง ๆ.....	97
ตารางที่ 22 ลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสของขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามที่ระดับต่าง ๆ.....	98
ตารางที่ 23 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของขนมบราวนี่กรอบเสริมแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามที่ระดับต่าง ๆ.....	99

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปลาบึกลูกผสม F_1 (พ่อปลาบึก x แม่ปลาสรวย)	6
ภาพที่ 2 ลักษณะภายนอกของปลาลูกผสมบึกสยามแม่โจ้	7
ภาพที่ 3 ที่มาของปลาลูกผสมบึกสยาม (ปลาลูกผสมรุ่นที่ 2).....	8
ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะของกระดูกปกติและกระดูกพรุน	15
ภาพที่ 5 โครงสร้างคอลลาเจน	25
ภาพที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของบราวน์	29
ภาพที่ 7 ลักษณะทางกายภาพของบราวน์กรอบ	30
ภาพที่ 8 แผนภาพกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม	34
ภาพที่ 9 กระดูกปลาลูกผสมบึกสยามเมื่อผ่านกระบวนการผลิตต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม. 50	
ภาพที่ 10 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามในระหว่างกระบวนการผลิต ขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม	57
ภาพที่ 11 รูปแบบโปรตีน (SDS – PAGE) ของกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามในระหว่างกระบวนการ ผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม	59
ภาพที่ 12 ค่า Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) ของกระดูกปลาลูกผสมบึก สยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม	62
ภาพที่ 13 การเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ของกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตใน ขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม	66
ภาพที่ 14 FTIR spectrum ของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามที่ผ่านกระบวนการ ผลิตในขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม	68
ภาพที่ 15 โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิต ขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียมที่กำลังขยาย 1500 เท่า	70
ภาพที่ 16 การวิเคราะห์การกระจายตัวของธาตุแบบ mapping analysis โดยใช้ SEM-EDX ของ กระดูกปลาลูกผสมบึกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม.....	71

ภาพที่ 17 ภาพถ่ายแสดงลักษณะของผงไปโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสม
บึกสยาม และแคลเซียมทางการค้า..... 74

ภาพที่ 18 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH* (A) กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ABTS* (B)
ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (C) และความสามารถในการจับกับโลหะ Fe²⁺ (D) ของไปโอ
แคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม และแคลเซียมทางการค้า 80

ภาพที่ 19 โครงสร้างทางจุลภาคของไปโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์สารจากกระดูกปลาลูกผสม
บึกสยาม และแคลเซียมทางการค้า..... 83

ภาพที่ 20 ภาพแสดงลักษณะของผงไปโอแคลเซียม (A) และไปโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล (B)..... 84

ภาพที่ 21 ค่าความหนาแน่นรวม (A) และค่าความหนาแน่นจำเพาะ (B) ของผงไปโอแคลเซียมจาก
กระดูกปลาลูกผสมสูตรต่าง ๆ..... 88

ภาพที่ 22 ร้อยละของการละลายที่ค่าพีเอชต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ไปโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล 4 สูตร
..... 89

ภาพที่ 23 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH* (A), กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ABTS* (B),
ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (C), ความสามารถในการจับกับโลหะ Fe²⁺ (D) ของไปโอแคลเซียม
บรรจุแคปซูล 4 สูตร..... 92

ภาพที่ 24 ภาพลักษณะพื้นผิว (A) และภาพตัดขวาง (B) ของผลิตภัณฑ์ขนมบรอนน์รอบเสริมไปโอ
แคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยามที่ระดับต่าง ๆ..... 95

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยนับว่าเป็นประเทศหนึ่งที่เป็นประเทศผู้นำในภาคการประมงของโลก ซึ่งในระหว่างปี พ.ศ. 2551 – 2560 ประเทศไทยมีผลผลิตสัตว์น้ำประมาณ 5000 ล้านตัน ซึ่งภาคการประมงมีส่วนสำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมที่ต่อเนื่องจากการประมง เช่น โรงน้ำแข็ง ห้องเย็น โรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ เป็นต้น นอกจากการทำประมงทางทะเลแล้ว การทำประมงน้ำจืดโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดก็มีความสำคัญทางเศรษฐกิจไม่แพ้กัน ซึ่งในปี พ.ศ. 2561 สามารถประมาณการผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงและผลิตภัณฑ์จากปลาน้ำจืดที่ส่งออกประมาณ 5 แสนตัน (กรมประมง, 2561) ปัจจุบันสัตว์น้ำจืดเศรษฐกิจกลุ่มปลาหนัง เช่น ปลานิล ปลาสวาย และปลาแพะ กำลังได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นอย่างสูง เนื่องจากเป็นสัตว์ที่เพาะเลี้ยงง่าย ราคาถูก และมีคุณค่าทางโภชนาการสูงที่อุดมไปด้วยโปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และกรดไขมันที่ดี โดยเฉพาะไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของสมอง (Hauser et al., 2018)

ปลานิล (*Pangasianodon gigas*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เป็นสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคชนิดหนึ่งในการนำมาประกอบอาหารและแปรรูป เนื่องจากมีรสชาติอร่อย เนื้อแน่น ทำให้ปัจจุบันปลานิลในแหล่งน้ำทางธรรมชาติเหลืออยู่น้อย ไม่เพียงพอต่อการจับและการนำมาบริโภค จึงทำให้นักวิจัยได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ปลานิล โดยนำปลานิลสายพันธุ์แท้ (*Pangasianodon gigas*) มาผสมกับปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ เรียกว่าปลาลูกผสมบิกสยาม (*Pangasianodon gigas* x *Pangasianodon hypophthalmus*) ซึ่งเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว คุณภาพเนื้อดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และทนทานต่อโรค ทำให้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อจำหน่ายทางการค้า ในลักษณะที่เป็นเนื้อปลาสด เนื้อปลาแช่เยือกแข็ง และผลิตภัณฑ์แปรรูปต่าง ๆ เพื่อขายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ ได้แก่ อเมริกา มาเลเซีย และสิงคโปร์ ซึ่งต่างประเทศมีความต้องการปลาในกลุ่มปลาน้ำจืดและผลิตภัณฑ์ประมาณ 1-2 ล้านตัน/ปี คิดเป็นมูลค่าหลายแสนล้านบาท สร้างรายได้อย่างมหาศาลให้แก่กลุ่มเกษตรกร (เกรียงศักดิ์ และจรรุวรรณ, 2554) การแปรรูปปลาลูกผสมบิกสยามในระดับอุตสาหกรรมเป็นผลิตภัณฑ์ปลาแช่เยือกแข็ง และผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป จะเกิดวัสดุเศษเหลือคือ กระดุกปลา ซึ่งมีมากถึงร้อยละ 40 ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ นอกจากไม่มีมูลค่าหรือมีมูลค่าต่ำแล้ว

ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากย่อยสลายยากและมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ จึงนิยมนำไปผลิตและขายเป็นอาหารสัตว์ราคาถูก อย่างไรก็ตามกระดูกปลาลูกผสมบึงสยามมีคุณค่าทางโภชนาการที่อุดมไปด้วยแร่ธาตุที่สำคัญ คือ แคลเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น และยังมีรายงานการใช้กระดูกปลาเป็นแหล่งแคลเซียมในอาหารสัตว์ (Malde et al., 2010)

แคลเซียม (Ca) เป็นองค์ประกอบของแร่ธาตุที่สำคัญต่อร่างกายมนุษย์ โดยเป็นส่วนประกอบสำคัญในฟันและกระดูก ขึ้นอยู่กับน้ำหนักของร่างกายคิดเป็นร้อยละ 1-2 อย่างไรก็ตาม การขาดแคลนแคลเซียมในร่างกายเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก เนื่องจากร่างกายได้รับปริมาณแคลเซียมไม่เพียงพอ หรือการดูดซึมแคลเซียมเข้าสู่ร่างกายในลำไส้ที่ไม่ดีทำให้มวลกระดูกลดลง เป็นสาเหตุของโรคกระดูกพรุน ดังนั้นประเทศต่าง ๆ จึงได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานในการบริโภคแคลเซียมแต่ละวัน เนื่องจากแคลเซียมฟอสเฟตเป็นแร่ธาตุหลักของกระดูกและฟัน หากได้รับประทานแคลเซียมไม่เพียงพอเป็นระยะเวลานานๆ อาจทำให้ภาวะกระดูกพรุน ซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นมากในวัยของผู้สูงอายุจนอาจเกิดการแตกหักของกระดูก จากการสำรวจการรับประทานแคลเซียมของคนไทย พบว่าคนไทยวัยผู้ใหญ่บริโภคแคลเซียมน้อยกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ควรได้รับ คือ เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 300 – 400 มิลลิกรัมต่อวัน จากปริมาณที่แนะนำ 800 มิลลิกรัมต่อวัน ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการบริโภคอาหารที่มีแคลเซียมต่ำ ดังนั้นการบริโภคอาหารเสริมแคลเซียมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการบริโภคอาหารที่มีปริมาณแคลเซียมที่เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย โดยเฉพาะสตรีวัยหมดประจำเดือน ซึ่งร่างกายจะมีการสลายแคลเซียมจากกระดูกมากขึ้น เนื่องจากขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ดังนั้นปริมาณแคลเซียมที่แนะนำให้สตรีหลังวัยหมดประจำเดือนรับประทานจึงสูงขึ้นเป็น 1,000 มิลลิกรัมต่อวัน (Thai, 1995)

ผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมที่วางขายในท้องตลาดมีหลากหลายรูปแบบให้ผู้บริโภคเลือกซื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคลเซียมอินทรีย์ ได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต ไตรแคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมซิเลต เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีแคลเซียมที่จับกับสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ แคลเซียมซิเตรทมาเลต แคลเซียมกลูโคเนต แคลเซียมแลคเตท และแคลเซียมที่จับกับกรดอะมิโนแอสพาร์ติก เป็นต้น ซึ่งความสามารถในการดูดซึมแคลเซียมของลำไส้ก็มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสูตรทางเคมีของสารประกอบแคลเซียมแต่ละชนิด โดยเฉพาะความสามารถในการละลายน้ำของแคลเซียม (Erfanian et al., 2017) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแคลเซียมที่มีประสิทธิภาพการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายในระบบทางเดินอาหารได้สูงมักละลายน้ำได้ดี เช่น แคลเซียมซิเตรท และแคลเซียมซิเตรทมาเลต เป็นต้น ซึ่งแคลเซียมทั้งสองชนิดมีราคาแพงกว่าแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งละลายน้ำได้น้อย

ปัจจุบันได้พัฒนาผลิตภัณฑ์แคลเซียมให้อยู่ในรูปอัดเม็ด และบรรจุในแคปซูล ซึ่งมีคุณสมบัติดูดซึมได้ดีในระบบทางเดินอาหาร (slowly release calcium) แคลเซียมในรูปแบบนี้จะทำให้ร่างกายดูดซึมแคลเซียมได้มากขึ้นแต่จะมีราคาสูงกว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแคลเซียมชนิดอื่น ๆ (World Health Organization, 2018) มีรายงานว่าผลึกแคลเซียมในกระดูกปลาจะอยู่ในรูปผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับที่พบในกระดูกมนุษย์ (Best et al., 2008) ในขณะที่ผลึกแคลเซียมในเปลือกไข่และเปลือกหอยนางรมจะอยู่ในรูปแคลเซียมคาร์บอเนต (Pal et al., 2017) ซึ่งแคลเซียมจากธรรมชาติเหล่านี้จะมีราคาถูกกว่าแคลเซียมสังเคราะห์กลุ่มแคลเซียมคีเลต และแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งสามารถละลายน้ำ ทำให้ดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดีในระบบทางเดินอาหาร ยังมีรายงานอีกว่ากระดูกปลาซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำซึ่งนอกจากจะอุดมไปด้วยแคลเซียมและฟอสฟอรัสแล้ว ยังมีคอลลาเจน คอนดรอยติน เปปไทด์ กรดอะมิโน และอนุพันธ์ของกรดอะมิโนอีกด้วย (He et al., 2014) ซึ่งกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโนบางชนิดที่พบมากในคอลลาเจน คือ โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน สามารถกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมผ่านทางลำไส้เล็กได้ดีในสัตว์ทดลอง (Chen et al., 2014) ซึ่งในระบบการเลี้ยงปลาลูกผสมบิกสยาม หากมีมาตรฐานการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีและเหมาะสม (Good Aquaculture Practice, GAP) จะทำให้มีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือมาผลิตเป็นไบโอแคลเซียม (Bio-calcium) ซึ่งไบโอแคลเซียมเป็นแคลเซียมที่มีสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งผ่านกระบวนการแปรรูปที่ไม่รุนแรง และใช้ความร้อนต่ำ ทำให้ไบโอแคลเซียมอุดมไปด้วยคอลลาเจน คอนดรอยติน เปปไทด์ และกรดอะมิโน เมื่อรับประทานเข้าสู่ร่างกายทำให้ดูดซึมในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าแคลเซียมสารอนินทรีย์ที่ใช้ความร้อนสูงมากกว่า 1,100 องศาเซลเซียส ในการเผาเพื่อกำจัดสารประกอบอินทรีย์ทั้งหมด และแคลเซียมในรูปแบบอื่น ๆ มีรายงานการใช้ผงไบโอแคลเซียมที่ผลิตจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบ (skipjack tuna) เสริมในแครกเกอร์โฮลวีทที่ระดับต่าง ๆ พบว่าการเสริมผงไบโอแคลเซียมที่ระดับต่าง ๆ มีผลต่อลักษณะคุณภาพด้านกายภาพและเนื้อสัมผัสของแครกเกอร์ (Benjakul and Karnjanapratum, 2018) ดังนั้นกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำที่อุดมไปด้วยแคลเซียม ฟอสฟอรัส และสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งเป็นวัตถุดิบมูลค่าต่ำทางเลือกที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นผงไบโอแคลเซียม ที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแคลเซียม และนำไปเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังนั้นคณะผู้วิจัยมีความสนใจพัฒนากระบวนการผลิต และศึกษาคุณลักษณะไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิก

สยาม ตลอดจนพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบอาหารเสริมไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงประยุกต์ใช้ผงไบโอแคลเซียมเสริมโภชนาการในผลิตภัณฑ์ขนมบราวนี่กรอบ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม
2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม เปรียบเทียบกับแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า
3. เพื่อพัฒนาสูตร และผลิตภัณฑ์ต้นแบบไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม ชนิดบรรจุแคปซูล
4. เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามเสริมในผลิตภัณฑ์บราวนี่กรอบ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สูตรกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามแม่โจ้
2. ทราบถึงคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม
3. ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามชนิดบรรจุแคปซูล
4. ได้ผลิตภัณฑ์บราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ปลาน้ำจืดในประเทศไทย

ปลาน้ำจืดมีความสำคัญกับคนไทยมาเนิ่นนานก่อนปลาทะเล เพราะสังคมไทยแต่เดิมนั้นอาศัยอยู่บนแผ่นดินเป็นส่วนมาก จึงต้องอาศัยน้ำจากแม่น้ำในการทำมาหากิน ใช้สอย และอาศัยพันธุ์ปลาน้ำจืดเพื่อเลี้ยงชีพ (ชวลิต, 2544) ในปัจจุบันพันธุ์ปลาน้ำจืด และถิ่นอาศัยได้ลดลงไปมาก เนื่องจากการเพิ่มของประชากร และการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมไปในทางที่เสื่อมลง ทำให้การจับปลาน้ำจืดจากแหล่งธรรมชาติมาบริโภค และขายทางการค้าเพียงอย่างเดียวไม่พอต่อความต้องการพื้นฐาน ทำให้มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยวิธีต่างๆ ขึ้น ทั้งจากพันธุ์ปลาพื้นเมืองและนำเข้าจากต่างประเทศ จนกลายเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สร้างอาชีพอาชีพที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ (ปฎิญา และคณะ, 2560) พันธุ์ปลาน้ำจืดของคนไทยนั้น พบแล้วประมาณ 700 ชนิด จาก 56 วงศ์ นอกจากนี้ก็ยังมีปลาที่นำเข้าจากต่างประเทศมาเพาะเลี้ยงอีก 10 ชนิด ปลาน้ำจืดของไทยทุกชนิดสามารถใช้เป็นอาหารได้ (ชวลิต, 2544)

2.1.1 ปลาหนังลูกผสม

ปัจจุบันกลุ่มปลาหนังลูกผสมเนื้อขาวได้รับความนิยมจากผู้บริโภค เนื่องจากเป็นอาหารสุขภาพที่มีคุณค่าทางโภชนาการ อุดมไปด้วยโปรตีน วิตามิน แร่ธาตุ และกรดไขมันที่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของสมอง จึงทำให้มีการเพาะเลี้ยงปลาหนังลูกผสมเนื้อขาวมากขึ้นในประเทศไทย ชนิดที่พบในตลาดภายในประเทศ ได้แก่ ปลามรกต ซึ่งเป็นปลาหนังลูกผสมกลุ่มปลาสวายผสมกับปลาเผา ส่วนที่พบในตลาดต่างประเทศ ได้แก่ ปลาดอลลีหรือปลาสวายเนื้อขาว (*Pangasius Dory*) โดยในปี พ.ศ.2560 ประเทศไทยมีการนำเข้าปลาดอลลี จากเวียดนามประมาณ 25,000 ตัน/ปี อีกทั้งยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกปี (จันทิมา, 2561) และในกลุ่มประเทศแถบยุโรป อเมริกา มาเลเซีย และสิงคโปร์ มีความต้องการ ปลาหนังกลุ่มนี้ในรูปปลาแล่นเนื้อ ประมาณ 1-2 ล้านตัน/ปี คิดเป็นมูลค่าหลายแสนล้านบาท (เกรียงศักดิ์ และคณะ 2556)



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปลาบึกลูกผสม F_1 (พ่อปลาบึก x แม่ปลาสวาย)

ที่มา: เกรียงศักดิ์ และคณะ (2555)

ปลาบึกลูกผสม F_1 (พ่อปลาบึก x แม่ปลาสวาย) ในช่วงตัวเล็กมีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วไม่แตกต่างกัน แต่พอโตขึ้นอัตราการเจริญเติบโต (น้ำหนักและความยาวของลำตัว) จะเริ่มแตกต่างกัน การเจริญเติบโตของปลาที่ต่างกันจะมีส่วนสำคัญ คือ ความหนาแน่นของปลา/พื้นที่ หรือปลาสายพันธุ์นี้เป็นปลาที่เจริญเติบโตเร็วกว่าปลาตัวอื่นในกลุ่มเดียวกัน พฤติกรรมการกินอาหารเก่ง และมีการเจริญเติบโตดี สำหรับปลาบึกลูกผสม F_1 ที่เจริญเติบโตเร็ว เนื่องจากปลาสวายเป็นปลาเลี้ยงที่มีลักษณะของสายพันธุ์เลี้ยงแล้วจึงมีลักษณะกินเก่งเช่นเดียวกับการเลี้ยงปลาตุ๊ก หรือปลาเผาในกระชัง ส่วนปลาบึกยังเป็นปลาที่มีสายพันธุ์ธรรมชาติอยู่มาก และไม่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงในตู้กระจกหรือกระชังที่มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับบ่อดินที่มีพื้นที่กว้าง และลึก ตลอดจนมีอาหารธรรมชาติที่อยู่ตามพื้นบ่อตามนิสัยการกินอาหารของปลาบึกได้ดีกว่า (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2556)

2.1.2 ปลาลูกผสมบึกสยาม

ปลาลูกผสมระหว่างพ่อปลาบึกกับแม่ปลาสวาย และปลาบึกสยาม (พ่อแม่เป็นลูกผสมระหว่างพ่อปลาบึกกับแม่ปลาสวาย) เริ่มจากการรวบรวมปลาบึกจากลุ่มแม่น้ำโขง และเลี้ยงเป็นพ่อแม่พันธุ์มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 และสามารถเพาะผสมเทียมเพื่อผลิตปลาบึกรุ่นแรก (F_1) ได้ในปี พ.ศ. 2545 จากนั้นเลี้ยงปลาบึกรุ่น F_1 ในบ่อดินจนกระทั่งมีความสามารถในการปรับตัวดี และสามารถเจริญพันธุ์เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ในบ่อดินอายุ 10 ปี โดยสามารถเพาะ และผสมพันธุ์ปลาบึกเพื่อผลิตปลาบึกรุ่นที่ 2 ได้เมื่อปี พ.ศ. 2550 ซึ่งพ่อแม่พันธุ์ปลาบึกจากรุ่น F_2 นี้เองสามารถเจริญพันธุ์ในบ่อดินภายในระยะเวลา 5 ปี และใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ผสมกับแม่ปลาสวายอายุ 3 ปี เพื่อผลิตปลาลูกผสมได้



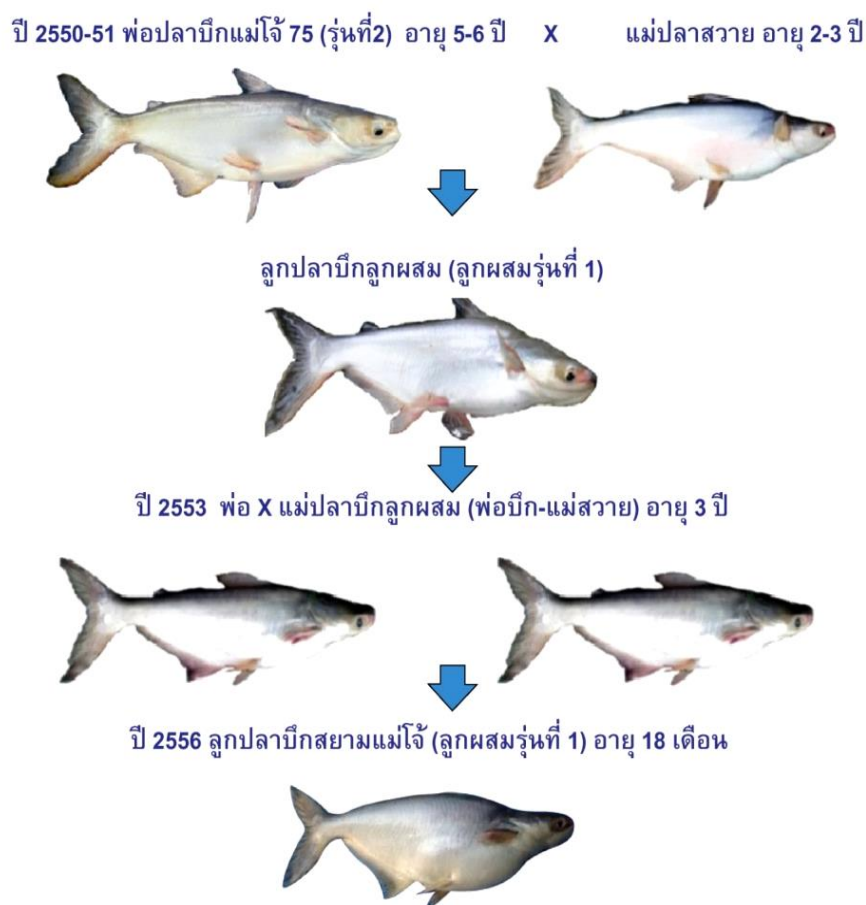
ภาพที่ 2 ลักษณะภายนอกของปลาลูกผสมบิกสยามแม่โจ้
ที่มา: เกரியงศักดิ์ และคณะ (2555)

เกரியงศักดิ์ และ จารุวรรณ (2554) ประสบผลสำเร็จในการผลิตปลาลูกผสมรุ่นที่ 1 ระหว่าง (พ่อปลาบิก x แม่ปลาสวาย) โดยพบว่าปลาชนิดนี้มีการเจริญเติบโตดีเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้ภายใน 3 ปี โดยให้น้ำเชื้อ และไข่ในปริมาณมาก มีอัตราการผสมติดสูงได้เป็นปลาหนึ่งลูกผสมรุ่นที่ 2 ที่เรียกว่า “ปลาบิกสยามแม่โจ้” ซึ่งถือว่าเป็นปลาเศรษฐกิจตัวใหม่ของวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ลักษณะภายนอกของปลาบิก ปลาลูกผสมบิกสยาม มีลักษณะภายนอกคล้ายกับปลาสวาย ข้อแตกต่างของปลาบิก ปลาสวาย และปลาลูกผสมบิกสยาม เมื่ออายุ 1-2 ปี สังเกตได้จาก ปลาบิกแท้จะไม่มีฟันบน และฟันล่าง ส่วนปลาลูกผสมบิกสยามแม่โจ้ จะมีฟันด้านล่างเล็กน้อย ขณะที่ปลาสวายจะมีฟันทั้งด้านบน และด้านล่าง ปลาลูกผสมบิกสยามแม่โจ้ มีขนาดโตกว่าปลาสวาย แต่เล็กกว่าปลาบิก การศึกษาเกี่ยวกับลักษณะภายนอกของปลาเหล่านี้ในช่วงที่มีขนาดเล็กลูกปลามีลักษณะที่คล้ายกันมาก และยากต่อการจัดจำแนก แต่เมื่อปลาเจริญเติบโตอายุประมาณ 1-2 ปี ลักษณะภายนอกของปลาเหล่านี้มีการแสดงออกที่ชัดเจนขึ้นทำให้สามารถจำแนกลักษณะภายนอกได้ (Sattang et al., 2018)

ตารางที่ 1 ลักษณะเด่นของปลาบิก ปลาสวาย ปลาลูกผสม และปลาลูกผสมบิกสยามแม่โจ้

สายพันธุ์ปลา	เนื้อ (%)	สีเนื้อ	การโตในบ่อดิน	การทนโรค
บิก	35	เหลืองอมชมพูแดง	ดีมาก	ดีมาก
สวาย	30	เหลือง	ปานกลาง	ดี
บิกลูกผสม	40	ขาวอมเหลืองอ่อน	ดี	ดีมาก
ลูกผสมบิกสยามแม่โจ้	45	ขาวอมชมพู-เหลืองอ่อน	ดีมาก	ดีมาก

ที่มา: เกரியงศักดิ์ และคณะ (2555)



ภาพที่ 3 ที่มาของปลาลูกผสมบึกสยาม (ปลาลูกผสมรุ่นที่ 2)

ที่มา : เกรียงศักดิ์ และคณะ (2555)

2.2 วัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลา

วัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาโดยทั่วไปได้แก่ หัว ใส้ ไขมัน ก้าง และหนัง แต่เดิมเศษเหลือเหล่านี้จะนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นอาหารสัตว์ เช่น ปลาป่น และปลาหมัก เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีที่ยุ่งยากซับซ้อน อย่างไรก็ตามวัสดุเศษเหลือจากสัตว์น้ำจัดเป็นวัตถุดิบที่มีคุณค่าทางอาหารที่สำคัญ เช่น กรดอะมิโน (Essential amino acids) และกรดไขมัน (fatty acids) ที่จำเป็นต่อร่างกาย และแคลเซียม เป็นต้น (พรรรถทิพย์ และคณะ 2555) ซึ่งวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปเหล่านี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงอื่น ๆ ได้อีกมากมาย เช่น ไขมัน อวัยวะภายในและเลือด สามารถนำมาพัฒนาเป็นน้ำมันปลา โปรตีนสกัด ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ ส่วนหัวและกระดูกปลา ใช้เป็นแหล่งแคลเซียม และส่วนหนังปลาสามารถพัฒนาผลิตเป็นคอลลาเจน เจลาติน และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ เป็นต้น (อัจฉราวรรณ, 2559)

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ซากจากการแปรรูปจากกลุ่มปลาหนึ่งน้ำจืดชนิดต่าง ๆ

เปอร์เซ็นต์ซาก	ค่าเฉลี่ย (%)			
	ปลาบึกสยาม	ปลาบึก	ปลาชวย	ปลาโมง
เนื้อ	52.11	49.32	51.54	31.0
เนื้อท้อง	8.19	8.80	9.21	19.0
หัวและกระดูก	36.45	41.96	40.92	38.9
เครื่องใน	3.83	4.92	4.95	5.4

ที่มา : พรรณทิพย์ (2555); อัจฉรวรรณ (2559)

2.3 แคลเซียม

แคลเซียม (Ca) เป็นแร่ธาตุที่พบในเปลือกโลกประมาณร้อยละ 5.4 พบอยู่ในรูปของสารประกอบ CaCO_3 ที่เป็นองค์ประกอบของหินปูน หินงอก หินย้อย ดินมาร์ล เปลือกหอย และพบในสารประกอบซิลิเกต เช่น ยิปซัม (Mohamed et al., 2012) Ca^{2+} เป็นไอออนประจุบวก (cation) ที่สำคัญของน้ำนอกเซลล์ มีความสำคัญต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ การหลั่งสารสื่อประสาท ช่วยในการแข็งตัวของเลือด Ca^{2+} ร้อยละ 99 เป็นส่วนประกอบของกระดูกมนุษย์ ซึ่งอยู่ในรูปของแคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์ ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ของแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมคาร์บอเนต ที่เรียงตัวกันแบบ crystal lattice ส่วนที่เหลือจะละลายอยู่ในน้ำของร่างกาย แคลเซียมในร่างกายมีอยู่ 3 รูปแบบ (Beto, 2015) คือ

1. แคลเซียมอิสระ (Ionized form: Ca^{2+}) เป็น physiological active form มีอยู่ประมาณร้อยละ 47 ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการทำงานของร่างกาย
2. แคลเซียมเชิงซ้อน (Complex calcium) เป็นแคลเซียมที่รวมตัวอยู่กับกลุ่มฟอสเฟต, ซิเตรท, ไบคาร์บอเนต และซิลิเกต มีอยู่ประมาณร้อยละ 6.5
3. โปรตีนจับกับแคลเซียม (Protein bound calcium) รวมตัวกับโปรตีนในพลาสมา มีอยู่ประมาณร้อยละ 46

2.3.1 หน้าที่ของ Ca^{2+} ในร่างกาย

1. เป็นส่วนประกอบของกระดูกและฟัน
2. จำเป็นต่อการทำงานของกล้ามเนื้อและระบบประสาท

3. เป็น second messenger ใน signal transduction ในการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนผ่าน cAMP หรือ cGMP หรือ DAG หรือ IP3 ทำให้มีการกระตุ้น Ca^{2+} dependent enzyme เช่น Ca^{2+} calmodulin dependent protein kinase (phosphorylase b kinase), NO synthase, cyclic nucleotides phosphodiesterase

4. ทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น เร่ง adenosine triphosphate (ATPase) และยับยั้งเอนไซม์ dipeptidase

5. จำเป็นต่อการแข็งตัวของเลือด

6. ช่วยในการย่อยโปรตีนของน้ำนม (Casein)

7. ช่วยในการสังเคราะห์หรือคัดหลัง และช่วยในการทำงานของฮอร์โมน

8. ช่วยในการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ โดยช่วยให้ผนังเซลล์คงรูป และช่วยให้เกิดการส่งผ่านไอออนหลายชนิดเข้ามาในเซลล์

2.3.2 ระดับแคลเซียมในร่างกาย

ค่าความเข้มข้นของแคลเซียมปกติ ในเซรัม (serum) อยู่ในช่วง 2.2 – 2.6 mmol/L ในขณะที่ยูรีนเท่ากับ (Urine) 42 – 353 mg/24 h หากแคลเซียมมีความผิดปกติทั้งมากเกินไปหรือน้อยไป อาจเกิดเนื่องจากพยาธิสภาพหรือการดูดซึมที่น้อยกว่าปกติ การดูดซึมแคลเซียมจะมาจากอาหาร โดยดูดซึมที่ลำไส้เล็กอาศัยวิตามิน D ที่อยู่ในรูป 1, 25 – dihydroxyvitamin D ($1, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) ซึ่งรูปนี้ถูกสร้างมาจากไต หรืออาจเกิดจากการเก็บหรือสลายแคลเซียมออกมาจากกระดูกในปริมาณที่ไม่เหมาะสม (Sutheechai and Sudchada, 2012)

2.3.3 ความสำคัญของแคลเซียมในทางคลินิก

1. โรคกระดูกที่เกี่ยวข้องกับการขาด Ca^{2+} คือ rickets, osteomalacia (bone matrix ปกติ แต่ Ca^{2+} ไปเกาะน้อยกว่าปกติ) และ osteoporosis (เกิดจากการสลาย Ca^{2+} ออกจากกระดูกมากเกินไป)

2. ภาวะ Ca^{2+} ในเลือดต่ำเกิน (Hypocalcemia) คือ อาการของภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำในระยะแรก คือ การชารอบปาก ชาที่ปลายมือ ปลายเท้า และหากระดับแคลเซียมในกระแสเลือดยังลดลงจะทำให้เกิดอาการต่าง ๆ ตามมาได้แก่ การเกิดตะคริว (tetany) หลอดลมหดเกร็ง (bronchospasm) ชัก (seizures) ความผิดปกติทางจิต (mental status change) กลองเสียงหด

เกร็ง (laryngospasm) หัวใจเต้นผิดจังหวะ (cardiac arrhythmias) โดยหากระดับแคลเซียมในเลือดที่ต่ำกว่า 8.0 mg/dL อาจจะทำให้เกิดภาวะ neuromuscular irritability และทำให้เกิดอาการแสดงคือ Chvostek's sign และ Trousseau's sign (Anansukhaban, 2018)

3. ภาวะ Ca^{2+} ในเลือดสูงเกิน (Hypocalcemia) ทำให้เกิดการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องผูก กล้ามเนื้ออ่อนแรงและความดันโลหิตสูง มีน้มน้ำ อาจถึงกับหมดสติ ภาวะแคลเซียมสูงอยู่ในเลือดนานๆ ร่วมกับระดับฟอสฟอรัสปกติหรือสูงจะเพิ่มการจับตัวเป็นแคลเซียมฟอสเฟตเกาะตามอวัยวะต่างๆ ที่ไม่ใช่กระดูก เช่น ตามผนังหลอดเลือด เนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบๆ ข้อ ผังกระดูก อาหาร กระดูกตา หรือทางเดินปัสสาวะ ซึ่งอาจเกิดขึ้นหลายสาเหตุ เช่น เป็นมะเร็งของต่อมพาราไทรอยด์ ได้รับวิตามินดีมากเกินไป hyperthyroidism, ไตวายเฉียบพลัน หรือการได้รับยาบางอย่าง เช่น ยาขับปัสสาวะ (thiazide) และ antiestrogen (tamoxifen) เป็นต้น

4. นิ่วแคลเซียม พบทั้งนิ่วแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) และแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ที่กรวยไต ซึ่งเป็นผลมาจากการจับแคลเซียมในปัสสาวะมากกว่าปกติ

5. การหดตัวของกล้ามเนื้อ ขึ้นอยู่กับ Ca^{2+} เช่นกัน ในปัจจุบันได้มีการใช้ยาลดหดเกร็งของกล้ามเนื้อ โดยเป็นยาในกลุ่ม calcium channel blocker เช่น nifedipine verapamil diltiazem ในผู้ป่วยที่ปวดกล้ามเนื้อหัวใจ (angina pectoris) เนื่องจากเลือดไปเลี้ยงหัวใจไม่เพียงพอจากสาเหตุเส้นเลือดโคโรนารีหดเกร็งโดยยาดังกล่าวจะทำให้หลอดเลือดขยายลดการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจและบรรเทาความเจ็บปวดได้

2.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อระดับแคลเซียมในเลือด

1. Parathyroid hormone (PTH) เป็นฮอร์โมนที่สังเคราะห์และหลั่งโดย chief cells ของต่อมพาราไทรอยด์ จะถูกกระตุ้นให้หลั่งเพิ่มขึ้นเมื่อระดับ Ca^{2+} ในร่างกายต่ำลง

- PTH มีหน้าที่นำ Ca^{2+} และ phosphorus (PO_4^{2-}) ออกจากกระดูก โดยกระตุ้นการทำงานของ osteoclasts ในการสลายกระดูก

- เพิ่มการสังเคราะห์ active vitamin D (1,25 dihydroxyvitamin D) หรือ calcitriol ที่ไต เพื่อช่วยให้มีการสลาย Ca^{2+} ออกจากกระดูกเพิ่มขึ้น

2. Calcitonin hormone เป็นฮอร์โมนที่สังเคราะห์จาก parafollicular cell ของต่อมไทรอยด์เป็นส่วนใหญ่ จากต่อมไทรอยด์และต่อมไทมัสเป็นส่วนน้อย การออกฤทธิ์จะตรงข้ามกับ PHT

คือ ช่วยลดระดับ Ca^{2+} ในพลาสมา โดยยับยั้งให้มีการสลาย Ca^{2+} และ phosphorus (PO_4^{2-}) ที่กระดูก โดยไปควบคุมปริมาณและการทำงานของ osteoclast และลดการดูดกลับที่ tubule ของไต

3. วิตามิน D ได้แก่ active vitamin D (1,25 dihydroxyvitamin D) หรือ calcitriol ช่วยให้การดูดซึม Ca^{2+} และ phosphorus (PO_4^{2-}) จากทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น ทำให้กระดูกสลาย Ca^{2+} เพิ่มมากขึ้น (Bone resorption) เพิ่มการดูดกลับของ Ca^{2+} ในไต ส่งผลทำให้แคลเซียมในเลือดเพิ่มมากขึ้น

4. serum หรือ plasma phosphate ระดับ Ca^{2+} และฟอสฟอรัสในเลือด จะมีความสัมพันธ์กลับกัน เช่น ในภาวะ uremia หรือ โรคไตเรื้อรังระยะท้ายๆ ระดับฟอสฟอรัสในเลือดสูงขึ้น เพราะไตขับไม่ออก แต่ระดับ Ca^{2+} ลดลง เหตุเพราะการสังเคราะห์ active vitamin D (1,25 dihydroxyvitamin D) หรือ calcitriol ที่ไตลดลง ทำให้การดูดซึม Ca^{2+} ลดลง

5. ไต มีบทบาทสำคัญในการเมตาบอลิซึมของ Ca^{2+} โดยมีหน้าที่

- สังเคราะห์ active vitamin D (1,25 dihydroxyvitamin D) หรือ calcitriol ทำให้ลำไส้ดูดซึม Ca^{2+} ได้

- tubule ของไต ดูดกลับ Ca^{2+} และยับยั้งการดูดกลับฟอสฟอรัสของ PTH

6. Sex hormone ทั้งของหญิงและชาย จะช่วยให้ Ca^{2+} และฟอสฟอรัสจับอยู่ในกระดูก แต่ในผู้สูงอายุจะมีการสลาย Ca^{2+} และฟอสฟอรัสออกจากกระดูกได้มากกว่าวัยรุ่น

7. Glucocorticoid ยับยั้งการดูดซึมของ Ca^{2+} จากลำไส้ และการเกาะของ Ca^{2+} ที่กระดูก

8. Thyroid hormone กระตุ้นการสลาย Ca^{2+} จากกระดูก

9. Growth hormone กระตุ้นการสังเคราะห์ active vitamin D (1,25 dihydroxyvitamin D) หรือ calcitriol

10. Inulin กระตุ้นการสังเคราะห์ collagen และลดการดูดกลับของ Ca^{2+} ที่ไต

2.3.5 การควบคุมแคลเซียมในร่างกาย

ระดับปกติของแคลเซียมในเลือด คือ 2.2 – 2.6 mM โดยฮอร์โมนหลักที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับแคลเซียมมีอยู่ 3 ชนิดด้วยกัน คือ

1.) Parathyroid hormone (PTH): เป็นเปปไทด์ฮอร์โมน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 84 อณู มีค่าครึ่งชีวิต (Half life) 20 – 30 นาที ถูกหลั่งออกมาจาก chief cell ของต่อมพาราไทรอยด์ (parathyroid gland) จะถูกกระตุ้นให้หลั่งเพิ่มขึ้นเมื่อระดับแคลเซียมในร่างกายลดต่ำลงมีฤทธิ์ ดังนี้

- กระตุ้นการทำงานของ osteoclast ให้ทำการสลายกระดูก และนำแคลเซียมและฟอสฟอรัส ออกจากกระดูก

- เพิ่มการสังเคราะห์ 1, 25 dihydroxyvitamin D (Calcitriol) ที่ไตซึ่งจะช่วยให้มีการสลายแคลเซียมจากกระดูกเพิ่มมากขึ้น และเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมจากลำไส้ได้ดีขึ้น

2.) 1, 25 dihydroxyvitamin D (Calcitriol): สารตั้งต้นได้มาจากการรับประทานอาหารที่มี D3 หรือจากการสังเคราะห์จากคอเรสเตอรอลที่ผิวหนัง (D2) แล้วจะถูกเปลี่ยนแปลงมาเป็น 1, 25 dihydroxyvitamin D ที่ไต ช่วยทำให้การดูดซึมแคลเซียมและฟอสฟอรัส ในระบบทางเดินอาหารได้ดีขึ้น ทำให้มีการเพิ่มการสลายแคลเซียมจากกระดูกและเพิ่มการดูดกลับแคลเซียมที่ไต

3.) Calcitonin ประกอบด้วยกรดอะมิโน 32 อณู สร้างมาจาก parafollicular cell (C cell) ของต่อมไทรอยด์ มีค่าครึ่งชีวิต 2 – 15 นาที ออกฤทธิ์ตรงข้ามกับ PTH คือ ช่วยลดระดับแคลเซียมในเลือด โดยควบคุมปริมาณและการทำงานของ osteoclast ส่งผลให้มีการยับยั้งการสลายแคลเซียมและฟอสฟอรัส จากกระดูกและลดการดูดกลับของแคลเซียมที่ไต

2.3.6 การดูดซึมแคลเซียม

แคลเซียมละลายได้น้อยมากในน้ำที่มีค่าพีเอช (pH) เป็นกลาง แต่แคลเซียมจะละลายดีขึ้นในสภาพเป็นกรดในกระเพาะอาหาร แล้วจึงดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็ก เกือบแคลเซียมจะถูกดูดซึมได้เพียงร้อยละ 20 -30 ของทั้งหมดที่บริโภคเข้าไป โดยการดูดซึมจะถูกดูดซึมบริเวณลำไส้เล็กตอนต้น (Duodenum) ซึ่งเป็นแบบที่ต้องใช้พลังงาน และจะมีการดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็กตอนกลาง (Jejunum) และลำไส้เล็กตอนปลาย (Ileum) เล็กน้อย และแคลเซียมจะหยุดการดูดซึมบริเวณส่วนล่างของลำไส้ที่อาหารมีสภาพเป็นด่าง (Goss et al., 2010) มีรายงานว่า การเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ทำให้กระดูกในภาพรวมความแข็งแรงของโครงร่างกระดูกลดลง ฮอร์โมน fibroblast growth factor-23 (FGF-23) เป็นฮอร์โมนที่สร้างจากกระดูก ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลฟอสเฟต โดยเร่งการขับฟอสเฟตทิ้งออกทางไต แต่ต่อมาพบว่า FGF-23 นั้นสามารถสร้างที่เซลล์เยื่อลำไส้ได้ (Wongdee et al., 2016) และมีบทบาทควบคุมการดูดแคลเซียมได้โดยตรงที่ลำไส้ ภาวะที่ลำไส้มีแคลเซียมปริมาณมาก ร่างกายจะสร้าง FGF-23 ออกมาตามไปด้วย เพื่อจำกัดการนำเข้าแคลเซียมสู่กระแสเลือด การที่ลำไส้ของผู้สูงอายุดูดซึมแคลเซียมลดลง เป็นเพราะ FGF-23 มีการแสดงออกหรือการทำงานมากขึ้นตามอายุ (Aeimlapa et al., 2018)

Monma และ Kanazawa (1978) รายงานว่าการละลายของ hydroxyapatite ขึ้นกับ $[H^+]$ ในกรดเกลือ โดยในสารละลายกรดเกลือที่มีค่าพีเอชต่ำ และความเป็นกรดสูงมีผลทำให้อัตราการละลายของ hydroxyapatite สูงกว่าสารละลายกรดเกลือที่มีค่าพีเอชสูง และมีความเป็นกรดต่ำ นอกจากนี้ Monma และ Kanazawa (1978) ยังพบอีกว่าการละลายของ hydroxyapatite ใน $0.5\% \text{ HCl} > 10\% \text{ citric acid} > 0.2\% \text{ HCl} > 2\% \text{ citric acid} > 0.1\% \text{ HCl}$

ตารางที่ 3 ความสามารถในการละลายของแคลเซียมในรูปไฮดรอกซีอะพาไทต์ และฟลูออโรอะพาไทต์ ในสารละลายกรดที่ค่าพีเอชต่างกัน

pH	การละลายของแคลเซียม (ppm)	
	Hydroxyapatite	Fluorapatite
5.0	50-180	18-24
6.0	8-22	4

ที่มา: Monma และ Kanazawa (1978)

2.3.7 โรคกระดูกพรุน (Osteoporosis)

คำจำกัดความของโรคกระดูกพรุน ปี ค.ศ. 2001 (NIH of USA) “โรคกระดูกพรุน คือ ความผิดปกติของกระดูกที่ทำให้ความแข็งแรงของกระดูกลดลง ทำให้ผู้นั้นเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกหักเพิ่มขึ้น โดยความแข็งแรงของกระดูกนี้เกิดจาก 2 ปัจจัยรวมกัน คือ ความหนาแน่นของกระดูก และคุณภาพของกระดูก” โรคกระดูกพรุน คือ โรคของกระดูกที่มีคุณลักษณะสำคัญ 2 ประการ คือ มีมวลกระดูกลดลงและมีโครงสร้างทางจุลภาคภายในของเนื้อเยื่อกระดูกเสื่อมสลายลง ส่งผลให้กระดูกมีความเปราะเพิ่มขึ้นและทำให้เกิดการหักของกระดูกได้ง่าย โดยเฉพาะกระดูกสันหลัง ข้อสะโพก ข้อมือ และกระดูกต้นแขนบริเวณหัวไหล่ (Taepongsorat, 2014)

2.3.7.1 การจำแนกประเภท

1) โรคกระดูกพรุนชนิดปฐมภูมิ (Primary osteoporosis) ได้แก่ โรคกระดูกพรุนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (postmenopausal osteoporosis) เกิดการสูญเสียมวลกระดูกจากภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นหลักและโรคกระดูกพรุนในวัยสูงอายุ (age-related หรือ senile osteoporosis) เกิดได้ทั้งในผู้ชายและผู้หญิง ซึ่งเป็นปัญหาหาจากการสร้างกระดูกได้น้อยลงจากความเสื่อมของเซลล์สร้างกระดูก

2.) **โรคกระดูกพรุนชนิดทุติยภูมิ (Secondary osteoporosis)** ได้แก่ โรคกระดูกพรุนที่มีสาเหตุหลายอย่าง ได้แก่ สาเหตุจากโรคทางต่อมไร้ท่อ เช่น Cushing's syndrome ภาวะ hypogonadism ต่อมไทรอยด์เป็นพิษ และภาวะฮอร์โมนพาราไทรอยด์สูง อีกทั้งสาเหตุจากโรคทางอายุรกรรม เช่น โรคไต โรคตับเรื้อรัง ภาวะดูดซึมอาหารผิดปกติหรือผ่าตัดกระเพาะอาหาร ข้ออักเสบรูมาตอยด์ สาเหตุจากการใช้ยา เช่น ยากลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ ยาต้านการแข็งตัวของเลือด (heparin และ warfarin) ยาแก้ชัก ได้แก่ phenytoin phenobarbital ยากดภูมิคุ้มกัน และยารักษามะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดจากสาเหตุอื่น ๆ เช่น ภาวะการรบกวนสารอาหาร โรคมะเร็ง และ multiple myeloma และโรค osteogenesis imperfecta



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะของกระดูกปกติและกระดูกพรุน
ที่มา: โรงพยาบาลแมคคอร์มิค (www, 2017)

2.3.7.2 อาการของโรคกระดูกพรุน

คนที่ป่วยเป็นโรคกระดูกพรุนมักจะทราบว่าตนป่วยเมื่อมีอาการแสดงไปแล้ว และยังมีอาการบ่งชี้ อื่นๆ ที่ควรใส่ใจสังเกตอาการเพื่อให้สามารถรักษาได้ทันการณ์ ดังนี้

1. กระดูกแตกหักได้ง่ายแม้ถูกกระแทกไม่รุนแรง
2. ปวดหลังเรื้อรัง
3. หลังงอ
4. ความสูงลดลง

2.3.7.3 สาเหตุของโรคกระดูกพรุน

กระดูกจะมีเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast) ทำหน้าที่สร้างกระดูกขึ้นมาใหม่จากแคลเซียมและโปรตีน ตามกระบวนการการเจริญเติบโตของร่างกายและทดแทนกระดูกส่วนที่สึกหรอ และมีเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast) ทำหน้าที่ที่ย่อยสลายเนื้อกระดูกเก่า โรคกระดูกพรุนเกิดจากการทำงานที่ไม่สมดุลกันของเซลล์กระดูก ทำให้มีการสลายกระดูกมากกว่าการสร้างกระดูก อาจเพราะมีปริมาณแคลเซียมในร่างกายไม่เพียงพอต่อกระบวนการสร้างกระดูก หรืออาจมีความผิดปกติของเซลล์กระดูก หรือเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. อายุ ด้วยวัยที่เพิ่มมากขึ้น กระบวนการเจริญเติบโตของร่างกายจะเริ่มช้าลง กระบวนการทดแทนกระดูกส่วนที่สึกหรอก็จะเป็นไปได้ช้า หากร่างกายขาดแคลเซียมในปริมาณที่จำเป็นต่อการสร้างกระดูก ก็เสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุน เมื่อแก่ตัวลงกระดูกก็จะบาง เปราะ แตกหักง่าย หากได้รับการกระตุ้นแม่ไม่รุนแรงก็ตาม เช่น การล้ม การกระแทก เป็นต้น

2. ฮอโมน การลดระดับของฮอโมนเอสโตรเจน (Estrogen) ในเพศหญิง อย่างการเข้าสู่วัยหมดประจำเดือน ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กระดูกพรุนและเปราะบางลง ส่วนในเพศชายจะมีความเสี่ยงเกิดโรคกระดูกพรุนเมื่อมีการผลิตฮอโมนเทสโทสเตอโรน (Testosterone) ลดน้อยลง

3. กรรมพันธุ์ ผู้ที่มีญาติใกล้ชิดทางสายเลือดที่มีประวัติป่วยเป็นโรคกระดูกพรุน ก็มีความเสี่ยงที่จะได้รับพันธุกรรมโรคดังกล่าวไปด้วย

4. ความผิดปกติในการทำงานของต่อมและอวัยวะต่างๆ เช่น ต่อมไทรอยด์ ต่อมพาราไทรอยด์ ต่อมหมวกไต ไตและตับทำงานผิดปกติ

5. โรคและการเจ็บป่วย ผู้ป่วยที่มีภาวะกระดูกพรุนอาจเกิดจากการเจ็บป่วยด้วยโรคต่างๆ เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับตับ ไต กระเพาะ ลำไส้อักเสบ โรคทางเดินอาหาร กรดไหลย้อน โรคความผิดปกติทางการกิน โรคภูมิแพ้ตัวเอง โรคแพ้กลูเตน โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคมะเร็งเม็ดเลือด โรคมะเร็งกระดูก

6. การบริโภค กินอาหารที่มีแคลเซียมไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายในการสร้างกระดูกและการเจริญเติบโต กินอาหารที่ทำให้แคลเซียมเสียสมดุล อย่างอาหารจำพวกโปรตีนจากเนื้อสัตว์ซึ่งมีความเป็นกรดสูง น้ำอัดลม ชา กาแฟ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และสูบบุหรี่ติดต่อกันปริมาณมากเป็นเวลานาน

7. การใช้ยา ผู้ที่ป่วยและต้องรักษาด้วยการใช้ยาบางชนิดติดต่อกันเป็นเวลานาน เช่น กลุ่มยาสเตียรอยด์ ก็มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุนเช่นกัน เพราะด้วยยาบางชนิดจะออกฤทธิ์ไป

รบกวนกระบวนการสร้างกระดูก เช่น ยาเพรดนิโซโลน (Prednisolone) มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ใช้รักษาอาการอักเสบและใช้รักษาร่วมในหลายโรค เช่น โรคหอบหืด หรือลมพิษ

8. การใช้ชีวิตประจำวัน การนั่งหรืออยู่ในอิริยาบถท่าใดท่าเดิมนาน หรือการทำงานที่ต้องเคลื่อนไหวร่างกายอย่างหนักส่งผลต่อสุขภาพกระดูกทั้งสิ้น และก่อความเสี่ยงให้เกิดโรคสูง

2.3.7.4 ภาวะแทรกซ้อนของโรคกระดูกพรุน

เมื่อกระดูกพรุน ปัญหาที่ตามมาคือ ความเจ็บปวดจากภาวะกระดูกทรุดตัว ปวดหลัง ส่งผลให้เคลื่อนไหวได้อย่างจำกัด มีความสามารถในการทำกิจกรรมต่างๆ ได้ลดลง โดยเฉพาะกิจกรรมนอกบ้านหรือการเข้าสังคม ทำให้อาจเก็บตัวแยกตัวออกจากสังคม ส่งผลให้อาจเกิดภาวะซึมเศร้าต่อไปได้ รวมทั้งกระดูกหัก โดยเฉพาะหากมีการแตกหักของกระดูกสะโพก จะทำให้ผู้ป่วยเดินไม่ได้ ขยับตัวลำบากเพราะความเจ็บปวด ต้องนั่งหรือนอนอยู่กับที่ตลอดเวลา จึงเสี่ยงต่อการเกิดโรคและอาการแทรกซ้อนซึ่งอาจเป็นเหตุให้เสียชีวิตได้ อย่างการเกิดแผลกดทับ หรือโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น

2.3.8 การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียม (calcium bioavailability)

การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียม (calcium bioavailability) หมายถึง ประโยชน์จริงที่ร่างกายได้รับจากการบริโภคแคลเซียมชนิดหนึ่ง ๆ ซึ่งจะพิจารณาทั้งการดูดซึมแคลเซียมชนิดนั้นเข้าสู่ร่างกายตลอดจนถึงการที่ร่างกายสามารถเก็บไว้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง ซึ่งแคลเซียมในอาหารและยามีหลายรูปแบบ ทำให้การดูดซึมและการนำแคลเซียมไปใช้ก็จะมีผลแตกต่างกันไป นอกจากนี้การรับประทานแคลเซียมร่วมกับอาหารอื่น ย่อมมีผลต่อแคลเซียมที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงทางชีวภาพเช่นกัน โดยประโยชน์ที่ร่างกายได้รับจริงทางชีวภาพของแคลเซียมนั้นจะขึ้นอยู่กับ สมบัติทางเคมีตามธรรมชาติของแคลเซียม แหล่งอาหาร และองค์ประกอบของอาหารแต่ละมื้อที่รับประทานเข้าไป ซึ่ง (Heaney et al., 1990) ศึกษาการดูดซึมของแคลเซียมจากผักโขม กระดุกป่น น้านมและผักเคล (kale) พบว่าแคลเซียมที่ได้จากอาหารแต่ละแหล่งจะมีการดูดซึมที่แตกต่างกันไป โดยจะเห็นได้ว่า ผักเคลจะมีการดูดซึมสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้านมและผักโขม นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการดูดซึมของแคลเซียมก็จะแตกต่างกันเมื่อรับประทานน้านมร่วมกับอาหารอื่นและไม่รับประทานร่วมกับอาหาร แคลเซียมจากกระดูกป่นจะถูกดูดซึมดีกว่าจากน้านมและผักโขม แคลเซียมจากผักเคลจะดูดซึมได้สูงสุด เนื่องจากผักเคลมีปริมาณแคลเซียมสูง และไม่มีออกซา

เลต ที่จะไปจับตัวกับแคลเซียมแล้วทำให้การดูดซึมของแคลเซียมลดลง ส่วนผักโขมถึงแม้จะมีแคลเซียมที่สูง แต่ก็มีออกซาเลตที่สูงด้วย จึงไปขัดขวางการดูดซึมแคลเซียม แคลเซียมจากน้ำนมจะมีการดูดซึมที่ดีเพราะน้ำตาลแลคโตสจะช่วยในการดูดซึมของแคลเซียมดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมจากกระดูกป่นมีการดูดซึมของแคลเซียมที่ดีกว่าแคลเซียมสังเคราะห์บางชนิด เช่น hydroxyapatite calcium carbonate และ tricalcium phosphate เป็นต้น ส่วนประโยชน์ที่ร่างกายได้รับจริงทางชีวภาพของแคลเซียมจากกระดูกปลาทูนานั้น Chen และคณะ (1998) รายงานว่า bioavailability ของแคลเซียมจากก้างกระดูกปลาทูนาน้ำตาลโตนี ซึ่งทำการทดลองกับหนูขาวตัวใหญ่พันธุ์ Sprague-Dawley (S-D) และเลี้ยงด้วยอาหารที่เตรียมไว้ พบว่าก้างและกระดูกปลาทูนานี้เป็นแหล่งแคลเซียมที่ดีต่อร่างกาย ซึ่งนอกจากจะยังมีปริมาณของแคลเซียมสูงและร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีแล้ว แคลเซียมจากก้างและกระดูกปลาทูนานี้ยังอยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตรายต่อไต โดยการก่อให้เกิดนิ่วในไตน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ dicalcium phosphate

2.3.8.1 อนุมูลอิสระ

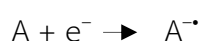
อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง คำจำกัดความนี้หมายรวมถึงอะตอมของไฮโดรเจน และไอออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอน แต่ละอิเล็กตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละวงโคจรหรือออร์บิทัล ทั้งนี้การสปินหรือการหมุนรอบตัวของอิเล็กตรอนทั้งสองจะสปินแบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสถานะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสถานะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูล หรืออนุมูลอิสระ คืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล A^{\bullet} อนุมูล $A^{-\bullet}$ และ อนุมูล $A^{+\bullet}$ โดยเฉพาะอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่วิในการเกิดปฏิกิริยาและสามารถคงอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรจำนวนน้อยชนิดมากตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$) อนุมูลไฮดรอกซี (HO^{\bullet}) อนุมูลอัลคอกซี (RO^{\bullet}) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี (HO_2^{\bullet}) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก และ

ขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรืออนุมูลไนตริกออกไซด์ ($\cdot\text{NO}$) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซี เป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวรอลงมา การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

ก. การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส



ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



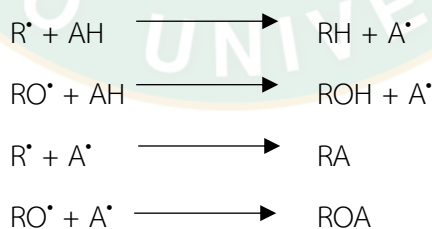
ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลที่มีบทบาทในทางชีววิทยา แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, RCS) สารบางชนิดจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์

2.3.8.2 การยับยั้งกิจกรรมด้านสารอนุมูลอิสระ

การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Valacchi et al., 2004) ดังสมการ



การยับยั้งการทำงานของซิงเกิลท์ออกซิเจน (Singlet oxygen quenching, $^1\text{O}_2\cdot$) สารที่อยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกิลท์ออกซิเจน โดยการเปลี่ยน ($^1\text{O}_2\cdot$) ให้อยู่ในรูปทริปเปรีท (triplet oxygen ($^3\text{O}_2$)) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน โดยที่แคโรทีนอยด์จำนวน 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกิลท์ออกซิเจนได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies et al., 1992)





โลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation) (Sanchez-Moreno et al., 2000) หรือโลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นต้น ซึ่งฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กรดฟอสฟอริกแอซิด (phosphoric acid) และกรดซิตริกแอซิด (citric acid) สามารถหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chainbreaking) ส่วนวิตามินอี (α -tocopherol; Toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลาย จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxy (ROO^{\cdot})

การเสริมฤทธิ์ (synergism) สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอี (α -tocopherol) กับวิตามินซี (ascorbic acid) โดยที่วิตามินซีไม่สามารถทำงานในสภาวะไม่มีขั้ว (hydrophobic condition) ได้เหมือนกับวิตามินอี แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลแอลฟา-โทโคฟีรอลเปอร์ออกซิล (α -tocopherol peroxy) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลฟา-โทโคฟีรอลกับอนุมูลเปอร์ออกซิล (ROO^{\cdot}) เพื่อเปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สามารถทำงานได้

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก (phenolic acid) และแกลเลต (gallates) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (เจนจิรา และประสงค์, 2554)

2.4 แคลเซียมที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี

การสังเคราะห์แคลเซียมด้วยกระบวนการทางเคมีในห้องปฏิบัติการเพื่อเลียนแบบแคลเซียมธรรมชาติ คือนำสารตั้งต้นตั้งแต่ 2 ชนิด มาทำปฏิกิริยากัน จนได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบแคลเซียมที่อยู่ในรูปของเกลือซึ่งมีอยู่หลากหลายชนิดมาก ดังตัวอย่างต่อไปนี้

2.4.1 แคลเซียมคาร์บอเนต

แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นส่วนผสมที่พบได้ในหินทั่วไปตามธรรมชาติ และพบได้ในเปลือกแข็งของสัตว์ทะเลและเปลือกไข่ มักถูกใช้เป็นส่วนผสมของยาลดกรดและอาหารเสริม

2.4.2 แคลเซียมซิเตรต

แคลเซียมซีเตรตเป็นเกลือแคลเซียมของกรดมะนาว ส่วนใหญ่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมการถนอมอาหาร แต่บางครั้งก็ใช้เพื่อเพิ่มรสเปรี้ยวของอาหาร ได้รับความนิยมนำมาทำเป็นอาหารเสริมแคลเซียมมากชนิดหนึ่งในปัจจุบัน

2.4.3 แคลเซียมกลูโคเนต

แคลเซียมกลูโคเนตได้จากการสังเคราะห์กรดกลูโคนิก นอกจากนิยมนำมาใช้เป็นอาหารเสริมแคลเซียมแล้วยังใช้เป็นส่วนผสมในยา เช่น ยาสำหรับภาวะโพแทสเซียมสูง ใช้ทำเป็นยาทาสำหรับผู้ที่ถูกกรดไฮโดรฟลูออริกกัด ใช้เป็นยาแก้พิษแมงมุมแม่มาyard

2.4.4 แคลเซียมแลคเตต

แคลเซียมแลคเตตใช้ผลิตผงฟู ใช้เพิ่มลงไปในการปราศจากน้ำตาลเพื่อป้องกันโรคฟันผุ ใช้ในการรักษาความสดและรสชาติของผลไม้ที่เพิ่งเก็บเกี่ยว

2.4.5 แคลเซียมฟอสเฟต

แคลเซียมฟอสเฟตพบมากในนมวัว และเป็นส่วนประกอบหลักในกระดูกและผิวเคลือบฟัน

2.4.6 แคลเซียมซีเตรตมาเลต

แคลเซียมซีเตรตมาเลตเป็นแคลเซียมที่ละลายน้ำได้ ร่างกายมีอัตราการดูดซึมแคลเซียมชนิดนี้สูง

2.4.7 แคลเซียมอโรเตต

แคลเซียมอโรเตตเป็นแคลเซียมที่เชื่อว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในตอนนี้ เนื่องจากร่างกายมีอัตราการดูดซึมแคลเซียมชนิดนี้สูงกว่าแคลเซียมชนิดอื่นๆ

2.5 ไบโอดีแคลเซียม

ไบโอดีแคลเซียมคือแคลเซียมอินทรีย์ที่ประกอบไปด้วยคอลลาเจน คอนดรอยติน เปปไทด์ และกรดอะมิโนที่มีค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียม (calcium bioavailability) สูงกว่าแคลเซียมบริสุทธ์ โดยเปปไทด์ดังกล่าวสามารถจับกับแคลเซียม (calcium chelating) และป้องกันการตกตะกอนของแคลเซียมในรูปเกลือแคลเซียมฟอสเฟต ทำให้ร่างกายการดูดซึมไบโอดีแคลเซียมได้ได้ดีกว่าแคลเซียมในรูปอื่น ๆ (Jung et al., 2006) กระดูกปลาจัดเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจที่เหมาะสมแก่การนำมาแปรรูปเป็นไบโอดีแคลเซียม เนื่องจากในกระดูกปลามีปริมาณแคลเซียมสูงถึงร้อยละ 34-36 ซึ่งสูงกว่าอาหารชนิดอื่น ๆ (Hamada et al., 1995) และยังคงอุดมไปด้วยคอลลาเจนและคอนดรอยติน ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำกระดูกปลามาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

ผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียม แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมที่ผลิตจากกระดูกปลานั้นยังมีข้อจำกัดในเรื่องของการนำไปใช้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาเรื่องกลิ่นคาว (fishy odor) ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีสาเหตุหลักจากเลือดที่ตกค้างในกระดูกและปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดกลิ่นหืนที่ไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์ (off-odor rancidity) ส่งผลให้อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สั้นลง (Idowu et al., 2019) นอกจากนี้ปัญหาด้านสีก็เป็นอีกหนึ่งข้อจำกัดของการนำไปใช้ ผลิตภัณฑ์ไม่ไปใช้งาน โดยสาเหตุหลักของการเกิดสีในผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมเกิดจากไขมันตกค้างอยู่ในกระดูกทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้ไบโอแคลเซียมที่ได้เกิดสีที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นจากปัญหาด้านกลิ่นคาวและสีที่ไม่พึงประสงค์จึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการนำกระดูกไปใช้เพื่อผลิตเป็นไบโอแคลเซียม ดังนั้นผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมที่ดีควรปราศจากกลิ่นคาว และมีสีขาวขึ้น โดยสามารถลดข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้งาน เช่น การใช้เสริมในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ หรือใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพโดยตรง (สุทธวัฒน์, 2559)

2.5.1 กระบวนการผลิตไบโอแคลเซียม

กระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกสัตว์ จะประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1) กระบวนการใช้ความร้อนด้วยการต้มในน้ำเดือด

Ishikawa และคณะ (1987) ได้ศึกษาผลของการต้มกระดูกปลาแมคเคอเรลในน้ำร้อนที่มีต่อการอ่อนตัวและการละลายของสารอินทรีย์ โดยนำกระดูกกระยางค์ส่วนบนของกระดูกปลาแมคเคอเรลมาต้มด้วยน้ำกลั่นในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 80-140 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้การอ่อนตัวของกระดูกเพิ่มขึ้นตามกัน เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อโครงสร้างของกระดูกปลาแมคเคอเรล ทำให้เกิดรูเล็ก ๆ และรอยแตกร้าวของกระดูกปลาแมคเคอเรล ซึ่งการเกิดรูเล็ก ๆ ของกระดูกจะเริ่มพบหลังจากต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยรูเล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะที่แหลมคมและขอบของรูไม่เรียบและเมื่อเวลาผ่านไป 40 นาที รูเล็ก ๆ ที่เกิดจะมีขนาดใหญ่และมุมของรูเรียบขึ้น นอกจากนี้การอ่อนตัวของกระดูกปลาแมคเคอเรลเกิดขึ้นเนื่องจากคอลลาเจนซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ให้ความเหนียวและแข็งแรงกับกระดูกเปลี่ยนเป็นเจลาติน จึงทำให้ความแข็งของกระดูกลดลง ซึ่ง Hatae และคณะ (1980) ก็พบเช่นเดียวกันว่าการต้มมีผลต่อการอ่อนตัวของกระดูกปลา และการใช้น้ำชาเขียวต้มกระดูกปลา (green tea infusion) มีผลทำให้กลิ่นคาวของปลาลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการต้มนอกจากจะมีผลต่อการอ่อนตัวของกระดูกปลาแมคเคอเรลแล้วยังมีผลต่อการละลายของสารอินทรีย์ในกระดูกปลาแมคเคอเรลอีกด้วย โดยเมื่อใช้อุณหภูมิและเวลาสูงขึ้นจะมีผลทำให้การละลายของสารอินทรีย์ในกระดูกปลาเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ดังนั้นการต้มจึงเป็นการกำจัดหรือลดปริมาณโปรตีนและไขมันออกจากกระดูกได้อีกด้วย (Ross,

2006) เนื่องจากโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในกระดุกเกิดการละลาย และไขมันลอยตัวออกมาตามรอยแตก และรูเล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นเมื่อให้ความร้อนกับกระดุกปลา ส่วนปริมาณเวลานั้นเวลาและอุณหภูมิไม่มีผลต่อ ปริมาณสารอินทรีย์หรือปริมาณไขมันในกระดุกปลา

2) การให้ความร้อนด้วยไอน้ำยิ่งยวด

โดยทั่วไปในการผลิตกระดุกสัตว์ป่นนั้นจะมีการใช้ไอน้ำภายใต้ความดันเพื่อทำให้กระดุกเกิดการเปราะแตกทำให้ง่ายต่อการบดเป็นผง Ishikawa และคณะ (1987) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลง ความแข็งของกระดุกปลา และร้อยละผลิตผลของเนื้อปลาที่ผ่านไอน้ำร้อนยิ่งยวดที่ความดันต่าง ๆ โดยขึ้นตัวอย่างเป็นแท่งเนื้อปลาขนาด 40 x 7 x 7 มิลลิเมตร ที่มีระยะก้นของกระดุกปลาแมคเคอ เรลอยู่ตรงกลางของแท่งตัวอย่าง แล้วนำไปผ่านไอน้ำร้อนยิ่งยวด อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 1.2 1.6 1.9 kgf.cm⁻² และอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียสความดัน 1.6 2.0 2.7 kgf.cm⁻² พบว่าไอน้ำมีผลทำให้น้ำหนักโดยรวมของผลิตผลในชิ้นตัวอย่างเพิ่มขึ้น และเมื่อความดันเพิ่มสูงขึ้นมีผลต่อ อัตราการนึ่งของชิ้นตัวอย่างเช่นกัน อัตราการนึ่งของชิ้นตัวอย่างอาจเกิดเนื่องมาจากการเพิ่มความดัน เป็นการเพิ่มแรงกดให้กับกระดุกปลาเป็นผลให้กระดุกปลาเกิดการแตกเปราะได้เร็ว

3) การใช้น้ำแรงดันสูง

การใช้น้ำแรงดันสูงเป็นการทำความสะอาดกระดุกปลาเบื้องต้น เพื่อกำจัดเศษเนื้อ น้ำเลือด และเศษไขมันที่ติดค้างอยู่บนกระดุก จากการศึกษาของ Benjakul และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษา คุณลักษณะของกระดุกปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบ (skipjack tuna) ที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ ในการผลิตไปโอแคลเซียม พบว่า ขั้นตอนการเตรียมกระดุกปลาโดยใช้เครื่องฉีดน้ำแรงดันสูงจะส่งผลให้ สามารถลดปริมาณกลิ่นหรือสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compounds) ออกจากกระดุกปลาทูน่าได้พันธุ์ทองแถบ (skipjack tuna) และยังสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้อีกด้วย เมื่อเทียบกับกระดุกที่ไม่ผ่านการทำความสะอาดด้วยการใช้น้ำแรงดันสูง

4) การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลาเจน

ภายหลังจากการเตรียมกระดุกปลาด้วยการล้างทำความสะอาดแล้ว กระดุกปลายังคงมีสิ่งตกค้างอยู่ ซึ่งไม่สามารถกำจัดได้หมดในขั้นตอนล้างด้วยน้ำเปล่า สารกำจัดโปรตีน สิ่งตกค้าง หรือสิ่งสกปรกที่ได้รับความนิยมในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ผงซักฟอก เบกกิ้งโซดา ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่าง มีฤทธิ์กัดกร่อน (Gerster et al., 2014) จากรายงานของ Benjakul และคณะ (2018) ได้ใช้สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ในการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลาเจนของกระดุกปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบ พบว่าสามารถกำจัดเศษเนื้อ เศษเลือด เอ็น หรือไขมัน ออกจากกระดุก ซึ่งขั้นตอนการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลาเจนสามารถปรับปรุงสีของกระดุกให้มีความสว่างขึ้น และยังสามารถลดกลิ่นเหม็นหืนจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน สารที่ระเหยได้หรือกลิ่นคาวปลาที่ไม่พึงประสงค์จากกระดุกปลาได้ และมีรายงานว่าโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

เป็นต่างแก่ชนิดหนึ่งที่ยินนำมาใช้ในการทำให้ตัวอย่างกระดูกขาวขึ้นได้ และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Taylor, 1967)

5) การกำจัดไขมัน

กระดูกปลาหลังจากการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนแล้วยังมีสิ่งตกค้างภายในกระดูกซึ่งก็คือ ไขมัน ซึ่งจะแทรกอยู่ภายในกระดูกและข้อต่อระหว่างกระดูก ทำให้ยังส่งผลกระทบต่อคุณภาพกระดูกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันทำให้เกิดกลิ่นหืนและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ได้ การสกัดไขมันในอุตสาหกรรม นิยมใช้ตัวทำละลายเฮกเซนซึ่งมีราคาถูก แต่การใช้ตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมนิยมใช้ตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายอีกทางเลือกที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้กำจัดหรือลดปริมาณไขมันในกระดูกได้

6) การฟอกสี

สีของผลิตภัณฑ์เป็นส่วนหนึ่งในการตัดสินใจในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ การปรับปรุงสีของกระดูก นิยมใช้สารกลุ่มออกซิไดซ์ คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการฟอกสีฟัน ซึ่งระดับความสว่างของกระดูกและฟันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้

7) การลดขนาด

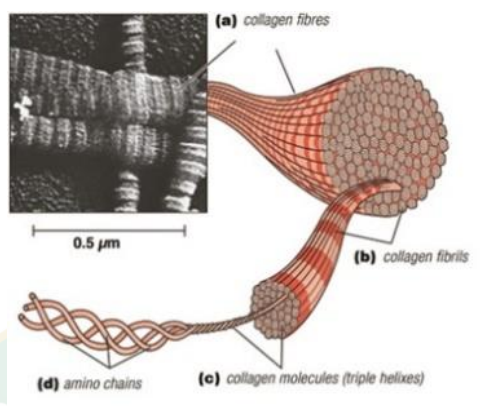
การลดขนาดเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตขั้นต่อไป โดยทำให้ของที่มีขนาดใหญ่มีขนาดเล็กลงด้วยแรงทางกลต่าง ๆ เช่น แรงกระแทก แรงตี แรงเฉือน เป็นต้น

2.6 คอลลาเจน

Collagen (คอลลาเจน) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก จากคำว่า “Kolla” แปลว่า กาว สมัยก่อนมีการนำหนังและเอ็นม้ามาเคี้ยวจนกลายเป็นกาว ใช้ประสานตะกร้าเพื่อความแข็งแรง (วริณญา, 2558) คอลลาเจน คือ โปรตีนเส้นใยที่พบมากที่สุดในร่างกาย เป็นโครงสร้างหลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ผิวหนัง และกระดูก พบประมาณ 30 % ของโปรตีนทั้งหมดในร่างกาย โดยจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างทำให้เนื้อเยื่อต่างๆ มีรูปแบบ มีความเหนียวและความแข็งแรง (Foegeding et al., 1996)

โครงสร้างพื้นฐานของคอลลาเจน หน่วยที่เล็กที่สุด คือ Polypeptide ที่มีความยาวประมาณ 1,050 กรดอะมิโน เนื่องจากในแต่ละสายพอลิเปปไทด์ (Polypeptied) มีโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนอยู่ ทำให้เกิดเกลียววนซ้ายที่มีกรดอะมิโน 3 ตัวต่อรอบ โดยกรดอะมิโนไกลซีนจะเรียงตัวเป็นแนวเดียวกันตลอดสาย ทำให้เกลียววนซ้ายของพอลิเปปไทด์ จำนวนสามสายมาพันกันเป็นเกลียวสามเส้นวนขวา (Right-handed triple helix) เกิดเป็นเกลียวของเกลียว (superhelix) ที่มีไกลซีนเรียงตัวเข้าหากันภายในเป็นแกนกลางเรียกว่า โทรโปคอลลาเจน (tropocollagen) สัดส่วนของกรดอะมิโนที่ประกอบกันเป็นคอลลาเจน จะแตกต่างกันไปจากที่พบในโปรตีนทั่วไป เช่น คอลลาเจนในผิวหนัง มี

กรดอะมิโนไกลซีนร้อยละ 33 กรดอะมิโนโพรลีนร้อยละ 13 กรดอะมิโนอนุพันธ์-4- ไฮดรอกซีโพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีนนี้จะไม่พบในโปรตีนชนิดอื่น (Shoulders and Raines, 2009)



ภาพที่ 5 โครงสร้างคอลลาเจน

ที่มา : The Statesman (www, 2019)

2.6.1 ไฮดรอกซีโพรลีน

ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) เป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนโพรลีน (Proline) ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลของคอลลาเจนและเจลาติน จึงพบมากในโปรตีนคอลลาเจนและเจลาติน การสังเคราะห์ไฮดรอกซีโพรลีนขึ้นอยู่กับวิตามินซี ดังนั้นการขาดวิตามินซีจะทำให้เส้นใยคอลลาเจนอ่อนแอ ทำให้เกิดแผลได้ง่าย ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งของโรคลักปิดลักเปิด (scurvy) องค์ประกอบและโครงสร้างองค์ประกอบหน่วยย่อยของคอลลาเจน คือ กรดอะมิโน (amino acid) ที่เรียงต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bond) เป็นสายพอลิเพปไทด์ ลำดับของกรดอะมิโนมักเป็นแบบ Gly-X-Pro หรือ Gly-X-Hypro และ Gly-Pro-Hypro (Gly = ไกลซีน (glycine) Pro = โพรลีน (proline) Hypro = ไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) และ X = กรดอะมิโนชนิดอื่น) รูปแบบการจัดเรียงซ้ำ ๆ ทำให้เกิดเป็นสายพอลิเพปไทด์ ที่มีพันธะระหว่างสายที่เป็นระเบียบแข็งแรง (Ignat'eva et al., 2007)

ไกลซีน (glycine) เป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุด มีบทบาทเด่นในโปรตีนโครงสร้างเส้นใยคอลลาเจน glycine จะอยู่ในทุกๆ ตำแหน่งที่สามของลำดับกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ การรวมตัวของสายเกลียวสามสาย ไกลซีนจะอยู่ด้านใน (แกน) ของสายเกลียว ส่วนวงแหวนของโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน จะยื่นออกด้านนอกจากสายเกลียว กรดอะมิโนโพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน จะช่วยให้หน่วยย่อยของโปรตีนคอลลาเจน เสถียรต่อความร้อน สายเกลียวทั้งสามสายยังเกิดพันธะโควาเลนต์พันกันไปมาระหว่างสาย และระหว่างหน่วยย่อยด้วยกันทำให้เกิดคอลลาเจนชนิดต่าง ๆ ที่พบได้

ในเนื้อเยื่อที่เจริญเต็มที่แล้ว ซึ่งหน่วยย่อยโทโปคอลลาเจนเข้ามารวมกันเองเป็นโครงข่ายขนาดใหญ่ขึ้นในที่ว่างภายนอกเซลล์ของเนื้อเยื่อ สายเกลียวทั้งสามอัดกันแน่นภายใต้แรงดึง ด้านทานการยืด จึงทำให้คอลลาเจนไม่ยืดเพราะในกระดูกสายเกลียวสามเส้นที่ควบกั้นจะวางซ้อนกันเป็นแถวหลวม ๆ ช่องว่างระหว่างปลายของหน่วยย่อยโทโปคอลลาเจนอยู่ห่างกัน 40 นาโนเมตร ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นใจกลาง (นิวเคลียส) สำหรับผลึกของเกลือแร่ซึ่งมีลักษณะละเอียด แข็ง และยาวมาจับ ได้แก่ ผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) ที่มีฟอสเฟตอยู่ด้วย กระดูกอ่อนอาจกลายเป็นกระดูกได้ด้วยวิธีนี้ (ขวัญชนก และคณะ, 2017) คอลลาเจนให้ความยืดหยุ่นแก่กระดูก จึงมีส่วนช่วยป้องกันกระดูกแตก (Isaksson et al., 2009) โดยประเภทของคอลลาเจนในปัจจุบันพบว่า คอลลาเจนแตกต่างกันมากกว่า 25 ชนิด แต่ละชนิดมีรหัสยีนแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามคอลลาเจนอาจมีได้มากกว่า 10,000 ชนิด แต่คอลลาเจนที่พิสูจน์ทราบได้แน่นอนแล้วมีเพียง 15 ชนิด คอลลาเจนที่สำคัญในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ คอลลาเจนชนิด I, II, III, V และ IX คอลลาเจนชนิด I เป็นคอลลาเจนหลักของผิวหนังและกระดูก มีมากที่สุดในร่างกาย (ประมาณร้อยละ 90 ของคอลลาเจนในร่างกาย) คอลลาเจนชนิด II พบในกระดูกอ่อน คอลลาเจนชนิด III พบในผิวหนัง หลอดเลือด และอวัยวะภายใน ส่วนคอลลาเจนชนิด V เป็นคอลลาเจนที่อยู่ในรูปโครงข่าย ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการสร้างพอลิเมอร์ ซึ่งทำให้เกิดเป็นชั้นปกคลุมผิวหนังด้านนอก หรือบุผิวที่เป็นโพรง (Birk et al., 1988) คอลลาเจนอาจจะแบ่งตามการละลายได้เป็น คอลลาเจนที่ละลายในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง สารละลายกรด และบางชนิดก็ไม่ละลายในสารละลายชนิดใด (Schnider and Kohn, 1981) อย่างไรก็ตาม คอลลาเจนประกอบด้วยสายของกรดอะมิโน 3 สาย แต่กรดอะมิโนที่นำมาใช้สร้างคอลลาเจนจะต่างจากกรดอะมิโนทั่วไป เช่น ไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนโพรลีน (Proline) คอลลาเจน พบในสัตว์ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เส้นเอ็น ผิวหนัง ข้อต่อ และกระดูกอ่อน โดยคอลลาเจน มี 28 ชนิด แต่ชนิดที่สำคัญในการสร้างเส้นใยและพบมากมี 5 ชนิด ได้แก่ (Gelse et al., 2003)

- Collagen I (ชนิดที่ 1) เป็นคอลลาเจนที่พบมากที่สุดร้อยละ 90 ของทั้งหมด พบที่ ผิวหนัง เอ็น กระดูก ผนังหลอดเลือด
- Collagen II (ชนิดที่ 2) พบที่กระดูกอ่อน กระจกตา
- Collagen III (ชนิดที่ 3) พบที่ผนังหลอดเลือด เนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ ผิวหนัง มดลูก ลำไส้
- Collagen V (ชนิดที่ 4) พบที่รากผม รก ผิวเซลล์
- Collagen XI (ชนิดที่ 5) พบที่กระดูกอ่อน กระจกตา

2.7 การประยุกต์ใช้แคลเซียมในผลิตภัณฑ์อาหาร

Wongtarue และคณะ (2020) ศึกษาผลของกระบวนการทางความร้อนต่อองค์ประกอบทางเคมีของผงแคลเซียมจากเปลือกหอยมุก (*Pinctada maxima*) และนำไปประยุกต์ใช้ในเจลซูริมิ โดยนำเปลือกหอยมุกไปเผาที่อุณหภูมิ 900 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง พบว่าผงแคลเซียมจากเปลือกหอยมุกมีค่าองค์ประกอบหลักถึงร้อยละ 95.74 – 99.37 และพบแคลเซียมในช่วงร้อยละ 41.17 – 62.04 ผงแคลเซียมจากเปลือกหอยมุกที่ได้นำไปเติมในผลิตภัณฑ์เจลซูริมิ พบว่าเมื่อซูริมิที่เติมแคลเซียมในระดับที่สูงขึ้นจะทำให้ซูริมามีค่าแรงก่อนการเจาะทะลุ (Breaking force) และค่าความแข็งแรงเจล (Gel strength) สูงขึ้นตาม นอกจากนี้การใช้ผงแคลเซียมจากเปลือกหอยมุกที่ระดับร้อยละ 0.075 เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการปรับปรุงคุณภาพเจลจากซูริมิจากปลาผสม

มีรายงานการนำกระดูกปลาโอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) มาใช้เป็นแหล่งแคลเซียมในผลิตภัณฑ์อาหารว่างกรอบเค็ม พบว่าการเสริมกระดูกปลาโอแถบปริมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้งส่งผลต่อค่าการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้ทดสอบชิม โดยมีแคลเซียม และฟอสฟอรัสในผลิตภัณฑ์สูงถึงร้อยละ 2.03 นอกจากนี้ยังมีรายงานการเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ (skipjack tuna) ในผลิตภัณฑ์แครกเกอร์โฮลวีต พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของกระดูกปลาทูน่า พันธุ์ท้องแถบ (skipjack tuna) หลังจากล้างน้ำแล้วพบว่ากระดูกปลาทูน่ามีแคลเซียม และฟอสฟอรัสสูงถึงร้อยละ 24.48 และ 10.12 ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงนำมาผลิตเป็นผงไบโอแคลเซียม และนำไปเสริมในแป้งแครกเกอร์โฮลวีตอัตราส่วนร้อยละ 40 และ 50 ตามลำดับ พบว่าผงไบโอแคลเซียมมีผลทำให้คุกกี้มีแรงต้าน และความหนาแน่นเพิ่มขึ้น แต่อัตราส่วนการขยายตัวลดลง เมื่อทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส การเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ (skipjack tuna) ปริมาณร้อยละ 50 โดยน้ำหนักแห้งในผลิตภัณฑ์แครกเกอร์ พบว่ามีคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคไม่ต่างจากชุดควบคุม อีกทั้งผลิตภัณฑ์มีแคลเซียม และฟอสฟอรัสสูงถึงร้อยละ 3.12 และ 2.03 ตามลำดับ (Benjakul และ Karnjanapratum, 2018)

Idowu และคณะ (2020) ได้ศึกษาการเสริมไบโอแคลเซียมและโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงกระดูกปลาแซลมอนในแครกเกอร์โฮลวีต พบว่าแครกเกอร์โฮลวีตเสริมไบโอแคลเซียม และโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงกระดูกปลาแซลมอนในอัตราส่วนไบโอแคลเซียมต่อโปรตีนไฮโดรไลเซต เท่ากับ 3 : 1 ไม่ส่งผลต่อการยอมรับทางประสาทสัมผัส อีกทั้งแครกเกอร์โฮลวีตเสริมไบโอแคลเซียม และโปรตีนไฮโดรไลเซตยังมีโครงสร้างเนื้อสัมผัสที่แน่น มีรูพรุนขนาดเล็ก และจำนวนมาก รวมถึงยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าแครกเกอร์โฮลวีตที่ไม่เสริมไบโอแคลเซียมและโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงกระดูกปลาแซลมอน

2.7.1 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Benjakul และคณะ (2017) ศึกษาเตรียมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ (skipjack tuna) ที่ผ่านการนึ่งด้วยไอน้ำความร้อน โดยใช้วิธีการต่าง ๆ ร่วมกันคือ การทำความสะอาดด้วยเครื่องฉีดน้ำแรงดันสูง ตามด้วยการแช่ในสารต่างสามารถกำจัดเนื้อสัตว์ และไขมันที่เหลือในกระดูกยังคงปริมาณของแคลเซียม และฟอสฟอรัสไว้ได้ จากนั้นนำกระดูกปลาไปแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซน ทำให้สามารถกำจัดไขมันออกจากกระดูกปลาได้ และสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ นอกจากนี้การฟอกสีกระดูกปลาด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ส่งผลให้กระดูกปลาความสว่างเพิ่มขึ้น (L^* value) ค่าความเป็นสีแดง (a^* value) และสีเหลือง (b^* value) มีค่าลดลง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแคลเซียมที่ได้ มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยพบการลดลงของสารที่ระเหยได้ในกลุ่มแอลดีไฮด์ คีโตนและแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ไบโอแคลเซียมมีคอลลาเจนเหลืออยู่ 179 residues/1000 residues ดังนั้นใช้วิธีการต่าง ๆ ช่างต้น ร่วมกันในการผลิตจะมีผลต่อสมบัติที่ดีของไบโอแคลเซียมทำให้สามารถดกกลืนควาปลาในไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ

นอกจากนี้ Benjakul และคณะ (2018) ยังได้ศึกษาคุณลักษณะการผลิตผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบเพิ่มเติม พบว่าไบโอแคลเซียมมีปริมาณแคลเซียมร้อยละ 40.35 และฟอสฟอรัสร้อยละ 15.28 สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผงแคลเซียมอนินทรีย์ที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิสูง (calcined bone) (ร้อยละ 26.91 และ 12.63 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามพบอัตราส่วนแคลเซียมและฟอสฟอรัสอยู่ในช่วง 1.62 - 1.65 นอกจากนี้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของผงแคลเซียมทั้งสองมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงเท่ากับ 17.07 - 20.29 ไมโครเมตร อย่างไรก็ตามผง calcined bone มีค่าสีเหลือง (b^*) สูงกว่าและมีค่าความสว่าง (L^*) ที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ผงไบโอแคลเซียม และ calcined bone มีการเกิดผลึกของ hydroxyapatite ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD) เท่ากับ 45.19 และ 74.69 % ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ Fourier transform infrared spectrum (FTIR) ในกระดูกทั้งสอง พบว่ากรดอะมิโน hydroxyproline ถูกตรวจพบเฉพาะในผงไบโอแคลเซียมเท่านั้น นอกจากนี้ผงไบโอแคลเซียมยังถูกตรวจพบสารที่ระเหยได้ในกลุ่มแอลดีไฮด์ แอลกอฮอล์และคีโตนในปริมาณที่ต่ำ ในขณะที่กระดูกที่ผ่านการเผา (calcined bone) แทบไม่พบสารในกลุ่มสารที่ระเหยได้ นอกจากนี้ Vujasinović-Stupar และคณะ (2009) ได้ศึกษาการเสริมไบโอแคลเซียมจากเปลือกหอยไข่มุกในสตรีวัยทองที่มีมวลกระดูกลดลง พบว่า ไบโอแคลเซียมจากเปลือกหอยมุกนั้นเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) พบว่าการเสริมแคลเซียมจากเปลือกหอยมุกนี้ส่งผลให้ค่า BMD เพิ่มขึ้นหลังจาก 6 เดือนที่ และยังไม่พบพิษใด ๆ ต่อร่างกาย

2.8 บราวนี่

“บราวนี่” ขนมหวานทรงสี่เหลี่ยมรสช็อกโกแลต มีสีน้ำตาลเข้ม ถูกจัดอยู่ในหมวดหมู่ คูกี้บาร์ ไม่จัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์เค้ก เนื่องจากมีลักษณะเป็นชิ้น สามารถใช้มือในการหยิบกินได้ (แม่หญิงแพรวา, 2563) ซึ่งวัตถุดิบหลักประกอบไปด้วย เนย น้ำตาล ช็อกโกแลต หรือผงโกโก้ ไข่ และแป้ง เป็นต้น



ภาพที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของบราวนี่

ที่มา : Mezzo (www, 2021)

ประเภทของบราวนี่ ถ้าหากแบ่งตามเนื้อสัมผัส จะแบ่งได้ 4 ประเภท

1. ฟัดจ์บราวนี่ (Fudgy brownie) คือ บราวนี่ที่มีเนื้อฉ่ำ หนึบหนับ มีหน้าฟิล์ม ซึ่งจะใช้ปริมาณแป้งไม่มาก และไม่ใส่ผงฟู และใช้วิธีการละลายเนยแทนการตีเนยกับน้ำตาล เพื่อลดฟองอากาศ ซึ่งวิธีนี้จะช่วยให้เนื้อของบราวนี่ฉ่ำ ส่วนผสมสำคัญที่เป็นเอกลักษณ์ คือช็อกโกแลต ซึ่งแนะนำเป็นช็อกโกแลตแท้ (Couverture chocolate) แบบไม่หวาน (unsweetened) และเติมน้ำตาลเพื่อเพิ่มความหวาน

2. บราวนี่เค้ก (Cake-like brownie) คือ บราวนี่ที่มีเนื้อนุ่มแบบเค้ก โดยจะใช้เนยปริมาณน้อยลงจากปกติและเพิ่มปริมาณแป้งมากกว่าสูตรฟัดจ์บราวนี่ และใช้ผงฟูเพิ่มเข้าไปเพื่อให้เนื้อเค้กมีความนุ่มและเบามากขึ้น นิยมใช้วิธีตีเนยกับน้ำตาลมากกว่าละลายเนยกับช็อกโกแลต ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มอากาศเข้าไปทำให้บราวนี่มีเนื้อที่ฟูและเบา

3. บราวนี่ชีวี่ (Chewy brownie) เป็นการผสมผสานระหว่างบราวนี่เค้ก และฟัดจ์บราวนี่ เนื้อเค้กที่ได้จะมีความเบาแต่ไม่เท่าเค้ก เพราะมีปริมาณไข่และแป้งน้อยกว่าเนื้อบราวนี่เค้ก แต่ก็มี ความแน่นของดาร์กช็อกโกแลต เพราะมีปริมาณดาร์กช็อกโกแลตมากกว่า และจากการใช้ช็อกโกแลต หั่นเป็นชิ้นผสมกับเนื้อแบทเทอร์ (batter) ก่อนนำไปเข้าอบ จะทำให้มีความชุ่มฉ่ำของช็อกโกแลต ละลาย ที่แทรกตามเนื้อ แต่ก็จะไม่หนึบเท่าฟัดจ์บราวนี่

4. บราวนี่กรอบ (Crispy brownie) เป็นอีกรูปแบบของบราวนี่ คือมีลักษณะเป็นแผ่นบาง กรอบ แต่ยังคงรสชาติที่เข้มข้นแบบบราวนี่ ตกแต่งหน้าตาให้สวยงามด้วยไวท์ช็อกโกแลตคอมพาวด์

ผลิตภัณฑ์อาหารว่างประเภทคุกกี้ เป็นผลิตภัณฑ์อาหารอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภค เนื่องจากมีให้เลือกหลากหลาย มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน อีกทั้งยังมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ (Gandhi et al., 2001) การเพิ่มคุณค่าทางด้านคุณค่าทางโภชนาการ และการปรับปรุงคุณภาพทางด้านเนื้อสัมผัสของคุกกี้ สามารถทำได้โดยการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบ หรือเสริมแต่งส่วนผสมอื่นในผลิตภัณฑ์ที่มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น มีรายงานของ Richardson และคณะ (2018) ศึกษาขนาดอนุภาคของน้ำตาลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและทางประสาทสัมผัสของช็อกโกแลตบราวนี่ พบว่าขนาดอนุภาคของน้ำตาลที่มีขนาดเล็กส่งผลต่อการรับรู้ระดับความหวานของช็อกโกแลตบราวนี่และยังทำให้เนื้อสัมผัสมีความนุ่มและชุ่มฉ่ำ นอกจากนี้จากรายงานการเสริมกระดูกปลานิลในคุกกี้เมลิตีแพลกซ์และอบเชย พบว่าการเสริมกระดูกปลานิลในระดับร้อยละ 12 ของน้ำหนักแป้ง เป็นที่ยอมรับจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส และสามารถเพิ่มปริมาณแร่ธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก จึงทำให้คุกกี้ที่เสริมกระดูกปลานิลมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าคุกกี้ธรรมดา (Abdel-Maemin, 2015)

บราวนี่กรอบเป็นอีกรูปแบบของบราวนี่ คือมีลักษณะเป็นแผ่นบางกรอบ แต่ยังคงรสชาติที่เข้มข้นแบบบราวนี่ ตกแต่งหน้าตาให้สวยงามด้วยไวท์ช็อกโกแลตคอมพาวด์ (พล, 2560) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์คุกกี้อีกหนึ่งชนิดหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยม อีกทั้งมีรายงานการศึกษา การยอมรับและพฤติกรรมของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์บราวนี่กรอบจากแป้งถั่วเขียวเพาะงอก พบว่าเหตุผลในการรับประทานบราวนี่กรอบ คือเป็นอาหารว่าง หาซื้อสะดวก และต้องการคุณค่าทางโภชนาการ อีกทั้งยังต้องการคุณค่าทางโภชนาการด้วย ผู้บริโภคร้อยละ 91 มีความยินดีที่จะซื้อผลิตภัณฑ์บราวนี่กรอบ และยังพบว่าการใช้แป้งถั่วเขียวเพาะงอกที่ระดับร้อยละ 25 ของน้ำหนักแป้ง ได้รับคะแนนความชอบสูงสุด (มุฮิมบ๊ะ และคณะ 2562)



ภาพที่ 7 ลักษณะทางกายภาพของบราวนี่กรอบ

ที่มา : Kapook (www, 2020)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. กระจุดกปลาอุกผสมบีกสยาม บริษัท โลฟ ฟาร์ม แลนด์ จำกัด
2. แคลเซียมทางการค้าในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต (Cal ups Join®, T.Man Pharma Co.,Ltd., Thailand)
3. แคปซูลเจลาติน เบอร์ 0 (Premier Pharma Supply Co.,Ltd., Thailand)
4. คอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Kal - G , MacroPhar Co., Ltd., Thailand)
5. วิตามินซี (Caicium ascorbate, Primo Trading Co., Ltd., Thailand)
6. มอลโตรเด็กซ์ตริน (Union Science Co.,Ltd. Thailand)
7. แป้งสาาลี (Kite® all-purpose flour, UFM FOOD CENTER Co., Ltd., Thailand)
8. เกลือ (Prung Thip®, SAHAPAT Co.,Ltd., Thailand)
9. ผงฟู (Imperial®, KCG Corporation Co., Ltd., Thailand)
10. ไข่ไก่สด (CP®, CPF Co., Ltd., Thailand)
11. เนยสดรสจืด (Allowrie®, KCG Corporation Co., Ltd., Thailand)
12. ดาร์คช็อคโกแลต (Tulip®, Sino - Pacific Trading Co.,Ltd., Thailand)
13. น้ำตาลป่น (Dynasty®, DYNASTY PACIFIC Co., Ltd., Thailand)
14. ผงโกโก้ (Tulip®, Sino - Pacific Trading Co.,Ltd., Thailand)
15. นมสด (Carnation®, F&N Dairies Ltd., Thailand)
16. กลีนวนิลลา (Winner®, Greathill Co., Ltd., Thailand)

เครื่องมือ

1. ตู้แช่เยือกแข็ง (SF-PC997, Panasonic, Thailand)
2. เครื่องฉีดย้ำแรงดันสูง (Warrior101, Polo, China)
3. เครื่องกวนสารแบบใบกวน (OS20-S, Overhead Stirrer, China)
4. เครื่องบดพินมิล (Retsch ZM1000, Centrifugal Grinding Mill, Singapore)
5. เครื่องวัดค่าสี (MiniScan XE Plus, Hunter Lab, Germany)

6. ตู้บรรมร้อน (FD56, Binder, China)
7. เครื่องวัดค่ากิจกรรมของน้ำอิสระ (Water Activity, a_w) (AQUA LAB, series 3 TE, USA)
8. เครื่อง Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, ICP-OES (Optima 8000, Perkin Elmer Instruments, USA)
9. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (WNB 10, Memmert, Germany)
10. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (VIS-732G, Rayleigh, China)
11. เครื่องอเล็กโตรโพรซิส (BioRad Laboratories, Inc., Richmond, CA., USA)
12. เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโน (L8900, Amino acid analyzer)
13. เครื่อง SPME GC MS (Gas Chromato grap – Mass Spectrometer) (7890 BGC-7000DMS, Agilent, USA)
14. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM-5410LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
15. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (innova 4340, Illuminated refrigerated incubator shaker, USA)
16. เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (CTX, Brookfield metek, UK)

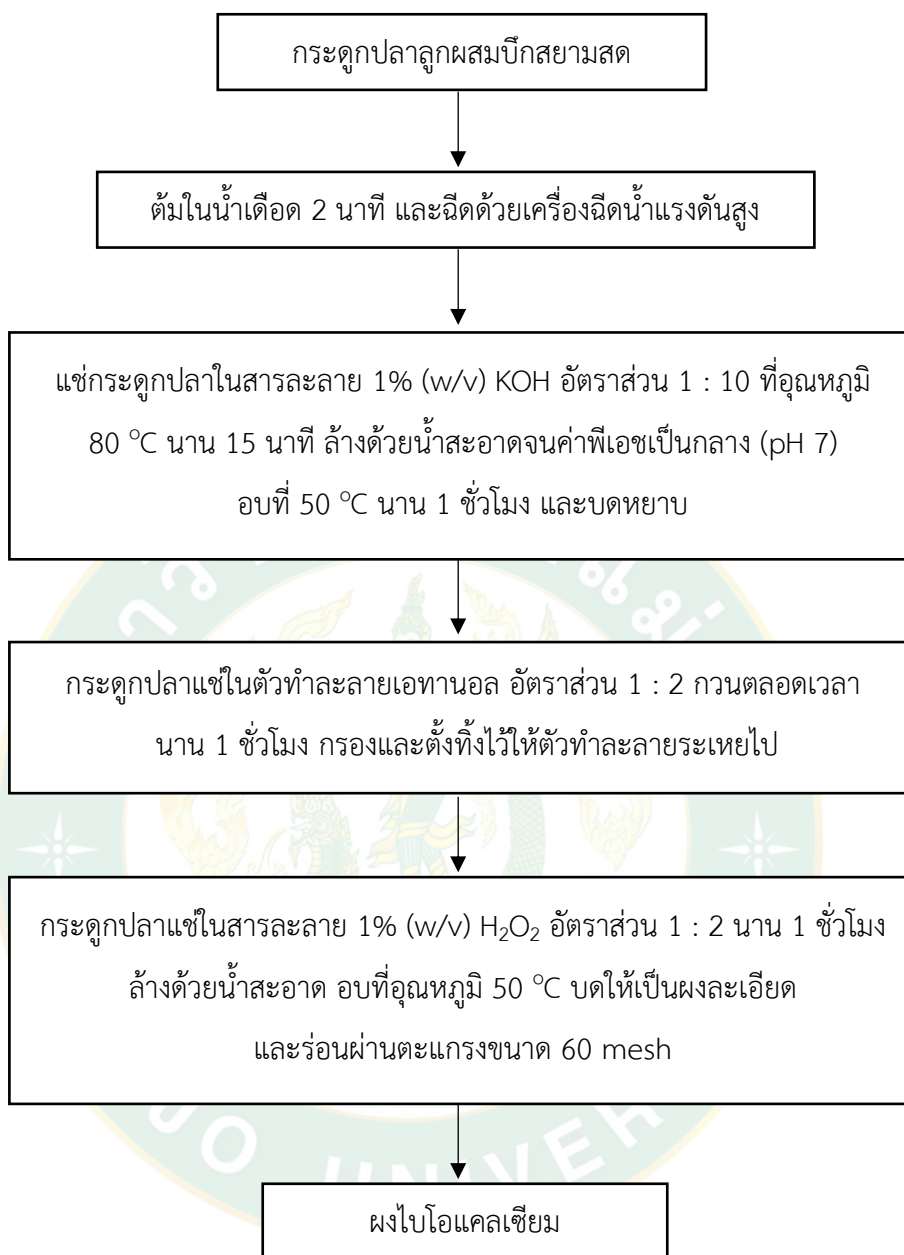
ตอนที่ 1 การพัฒนากระบวนการผลิตและคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมกระดูกจากปลาลูกผสม บึกสยาม

1. 1. การเตรียมโครงกระดูกปลา

นำกระดูกแกน (axial skeleton) ของปลาลูกผสมบึกสยามหลังจากกระบวนการผลิตเนื้อปลาแล้ว เนื้อแช่เยือกแข็งของบริษัท โลฟ ฟาร์มแลนด์ จำกัด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ มาล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก และเศษเนื้อที่ติดค้างอยู่ จะได้กระดูกที่สะอาด ก่อนเก็บในถุงพลาสติก โพลีเอทิลีน แล้วนำไปบรรจุใส่ลังโฟมที่เติมน้ำแข็งในอัตราส่วนโครงกระดูกต่อน้ำแข็ง 1 : 2 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้น้อยกว่า 4 องศาเซลเซียส ก่อนขนส่งมายังโรงงานนำร่องของสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเก็บรักษาไว้ในตู้แช่เยือกแข็ง (SF-PC997, Panasonic, Thailand) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ไม่เกิน 1 เดือน) เพื่อนำมาศึกษากรรมวิธีการผลิต และคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมต่อไป

1.2 กระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม

ผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามโดยดัดแปลงวิธีการของ Benjakul และคณะ (2017) นำตัวอย่างกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามสดแช่เยือกแข็งมาทำละลาย (0) โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (24-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ก่อนใช้เครื่องฉีดย้ำแรงดันสูง (Warrior101, Polo, China) มาฉีดย้ำแรงดันสูงเพื่อกำจัดเศษเนื้อปลาที่ติดอยู่กับโครงกระดูกและล้างทำความสะอาด จะได้กระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการฉีดย้ำ (1) จากนั้นนำกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามไปต้มกับสารละลายต่าง โฟแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอัตราส่วนกระดูกต่อสารละลาย 1 : 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดหลายครั้งจนกระทั่งตัวอย่างมีค่าพีเอชเป็นกลาง (pH 7.0 – 7.5) จากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน (FD56, Binder, China) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ความชื้น $4 \pm 1\%$) และลดขนาดให้ได้ขนาดอนุภาคประมาณ 2 - 4 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องบดของแห้ง (FDM303SS, Kenwood, Thailand) จะได้กระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการล้างน้ำต่าง (2) จากนั้นนำกระดูกปลาที่ผ่านการบดแช่ในเอทานอลร้อยละ 95 ในอัตราส่วนกระดูกต่อตัวทำลายเอทานอล 1 : 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) กวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนสารแบบใบกวน (OS20-S, Overhead Stirrer, China) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อทิ้งตัวทำละลาย ก่อนแยกเอากระดูก โดยนำกระดูกที่ผ่านการกรองตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30 องศาเซลเซียส) จนกว่ากลิ่นสารละลายจะหมดไปใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จะได้กระดูกปลาที่ผ่านการแช่ตัวทำละลาย (3) จากนั้นนำกระดูกปลามาแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอัตราส่วนกระดูกต่อสารละลาย 1 : 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) กวนอย่างต่อเนื่องนาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างทำความสะอาดด้วยน้ำก่อนนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ความชื้น $4 \pm 1\%$) และบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดพินนิล (Retsch ZM1000, Centrifugal Grinding Mill, Singapore) จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh จะได้เป็นผงไบโอแคลเซียม (4) เก็บไว้ในถุงอะลูมิเนียม ฟรอยด์ซีลปิดปากถุงให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวิเคราะห์คุณลักษณะของไบโอแคลเซียมต่อไป



ภาพที่ 8 แผนภาพกระบวนการผลิตไปโอแคลเซียมจากกระตูกปลาอุกผสมบีกสยาม

1.3 การศึกษาคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยาม

1.3.1 ลักษณะทางกายภาพ

1.3.1.1 ร้อยละผลผลิต

การคำนวณหาค่าร้อยละผลผลิต (% Yield) ของกระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการต่างๆ โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักกระดูกปลาหลังผ่านกระบวนการต่าง ๆ กับน้ำหนักกระดูกปลาเริ่มต้นตั้งสมการ

$$\text{ร้อยละผลผลิต (\% yield)} = \frac{\text{น้ำหนักกระดูกปลาหลังผ่านกระบวนการต่าง ๆ} \times 100}{\text{น้ำหนักกระดูกปลาเริ่มต้น}}$$

1.3.1.2 ค่าสี

วิเคราะห์ค่าสีของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียมด้วยเครื่องวัดค่าสี (ColorFlex EZ, Hunter Lab) ในระบบ CIE โดยวิเคราะห์ค่า L* value (ค่าความสว่าง), a* value (สีแดง/เขียว), b* value (สีเหลือง/สีน้ำเงิน) และวิเคราะห์ความต่างของสี ΔE^* (ความแตกต่างของสีโดยรวม)

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

โดยที่ ΔL^* , Δa^* และ Δb^* คือ ความต่างระหว่างพารามิเตอร์สีของตัวอย่าง และพารามิเตอร์สีของสีขาวมาตรฐาน ($L^* = 93.59$, $a^* = -0.98$ และ $b^* = 0.35$) ซึ่งใช้เป็นแผ่น Background

1.3.2 วิเคราะห์คุณลักษณะทางด้านเคมี

1.3.2.1 องค์ประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียมมาวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมัน ตามวิธีของ AOAC วิธีการที่ 927.05, 942.05, 920.38B และ 984.13 ตามลำดับ (AOAC, 2000)

1.3.2.2 ปริมาณแร่ธาตุและโลหะหนัก

วิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุของกระดูกปลาสด กระดูกปลา และผงไบโอแคลเซียม ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) (Optima 8000 Perkin Elmer Instruments, USA) โดยจะตรวจวิเคราะห์ธาตุแคลเซียม (Ca) ฟอสฟอรัส (P) และเหล็ก (Fe) ในตัวอย่างตามวิธีการของ Feist และ Mikula (2014) ความยาวคลื่นที่ใช้สำหรับธาตุ Ca, P และ Fe คือ 317.933, 213.617 และ 238.204 นาโนเมตร ตามลำดับ และวิเคราะห์สารปนเปื้อน

โลหะหนัก คือ สารหนู (As), ปรอท (Hg), ตะกั่ว (Pb), ดีบุก (Sn), สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ.2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน

1.3.2.3 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

วิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในกระดุกปลาที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนนี้ต่าง ๆ จนเป็นผงไปโอแคลเซียม ดัดแปลงจากวิธีของ Bergman และ Loxley (1963) เตรียมตัวอย่าง 2 กรัมในหลอดทดลองฝนเกลียว จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น 6 M ปริมาณ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะมีฟองก๊าซเกิดขึ้น รอจนฟองก๊าซหายไปจึงปิดฝาแล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำมัน (oil bath) (WB2000, Heidolph, Germany) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นเติม activated charcoal 0.2 กรัม แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex (G-560E, Bohemia, USA) ก่อนกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman no. 4) จากนั้นนำส่วนใสของตัวอย่างมาปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 10 M และ 1 M ให้อยู่ในช่วง 6.0 – 6.5 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติม isopropanol ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลาย oxidant ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ Chloramine – T reagent เข้มข้นร้อยละ 7 (w/v) และ acetate/citrate buffer pH 4.6 ในอัตราส่วน 1 : 4 (v/v) จากนั้นเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ 4 – dimethylaminobenzaldehyde จำนวน 2 กรัม ละลายในกรดเปอร์คลอริก (perchloric acid) เข้มข้นร้อยละ 60 (w/v) และ isopropanol ในอัตราส่วน 3 : 13 (v/v) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (WNB 10, Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ทำให้เย็นโดยการเปิดน้ำไหลผ่านตลอดเวลาประมาณ 2 – 3 นาที จากนั้นเจือจางด้วย isopropanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (VIS-732G, rayleigh, China) เพื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) ในช่วง 10 – 60 ppm รายงานผลในหน่วย mg/g sample

1.3.2.4 วิเคราะห์รูปแบบโปรตีน (SDS – PAGE)

วิเคราะห์รูปแบบโปรตีนในกระดุกปลาที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนนี้ต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม ด้วยเทคนิค SDS – PAGE ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Laemmli (1970) โดยเตรียมตัวอย่างกระดุกปลาจากแต่ละขั้นตอนการผลิตจำนวน 1 กรัม ละลายในสารละลาย sodium lauryl sulphate (SDS) เข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และให้ความร้อนแล้วที่ 95 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สารละลายโปรตีนส่วนใส (supernatants) นำตัวอย่างโปรตีนส่วนใสที่สกัดได้ผสมกับ sample buffer (ประกอบด้วยสารละลาย 0.6 M Tris-HCl ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.8, SDS ร้อยละ 2, glycerol ร้อยละ 10, bromophenol blue ร้อยละ 0.025 และ β mercaptoethanol (BME) ร้อยละ 10) ในอัตราส่วน 1 : 1 นำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแยกรูปแบบโปรตีนโดยใช้โพลีอะคริลลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 เป็น Stracking gel และความเข้มข้นร้อยละ 7.5 เป็น Separating gel ใช้ความต่างศักย์ที่ 220 โวลต์ และกระแสไฟฟ้าที่ 15 มิลลิแอมแปร์ ด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad Laboratories, Inc., Richmond, CA., USA) นาน 45 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วยสารละลาย Coomassie blue R-250 เข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) ที่ละลายในสารละลายเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 15 (v/v) และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 5 (v/v) เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นล้างสีย้อมด้วยสารละลายเมทานอลร้อยละ 30 (v/v) ที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 10 (v/v) จนได้แผ่นเจลที่มีพื้นหลังใส วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเทียบกับโปรตีนมาตรฐานในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 37, 50, 75, 100, 150 และ 250 kDa หาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐานต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของ Tracking dye แล้วนำมาคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility, R_f)

$$\text{ค่า } R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ Tracking dye จากจุดเริ่มต้น}}$$

จากนั้นจึงนำมาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน นำค่า R_f ของโปรตีนตัวอย่างที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในกระดุกปลาจากขั้นตอนการผลิตต่าง ๆ

1.3.2.5 วิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโน

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนในตัวอย่างกระดุกปลาสดเริ่มต้น (0) และผงใบโอแคลเซียมจากกระดุกปลาลูกผสมบึงสยาม วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนในตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC (2000) (วิธีที่ 994.12) โดยนำตัวอย่างมาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 6M ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์องค์ประกอบอะมิโนด้วยเครื่อง amino acid analyzer (L-8900, Hitachi amino acid analyzer)

1.3.2.6 วิเคราะห์การออกซิเดชันของไขมัน

วิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในกระดุกปลาลูกผสมบึงสยามจากกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงใบโอแคลเซียม ด้วยวิธี Thiobarbituric acid-reactive

substances (TBARS) (Buege and Aust, 1978) โดยนำตัวอย่างกระดูกปลาบดละเอียด 1 กรัม ผสมกับสารละลายที่มี thiobarbituric acid ร้อยละ 0.375 (w/v), trichloroacetic acid ร้อยละ 15 (w/v) และ 0.25 M HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจิไนซ์ด้วยเครื่องโฮโมจิไนซ์เซอร์ (T25, Ultra-turrax, Burlin, Germany) ที่ความเร็ว 15000 rpm นาน 1 นาที และปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท ก่อนนำไปให้ตั้งในน้ำเดือด (100 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นด้วยการแช่หลอดทดลองในน้ำประปา และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (RC 5C plus, Sorvall, NY., USA.) ความเร็ว 5,600xg ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกส่วนที่ละลายได้ (supernatant) ออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสง วัดที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (VIS-723G, Rayleigh, Beijing, China) เทียบกับกราฟมาตรฐานของ 1,1,3,3-tetramethoxypropane (MDA) ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 6 ppm แสดงผลการทดลองในหน่วยมิลลิกรัมมาโลอัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง

1.3.2.7 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบที่ระเหยในตัวอย่างกระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม โดยใช้เทคนิค solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (SPME-GC-MS) ตามวิธีของ Iglesias และ Medina (2008) เริ่มจากการสกัดสารประกอบที่ระเหยได้โดยนำตัวอย่างบรรจุขวดตัวอย่าง (headspace vial) แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 10 ชั่วโมง และทำการปรับสภาพ SPME Fiber (Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30 μm , 2 cm) ด้วยอุณหภูมิ 270 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนทำการดูดซับสารประกอบที่ระเหยได้โดยใช้ SPME Fiber จากขวดไวแอลที่บรรจุตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ SPME Fiber ที่ดูดซับสารประกอบที่ระเหยได้ฉีดเข้าสู่ GC-MS (7890 B GC – 7000 DMS, Agilent, USA) โดยใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิเริ่มต้นจาก 35 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นถึง 70 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 3 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปจนถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และสุดท้ายเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปจนถึง 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 15 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วคงอุณหภูมิไว้ อีก 10 นาที โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา (carrier gas) ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นระบุสารประกอบที่ตรวจวัดได้โดยเปรียบเทียบกับมาตรฐานจาก ChemStation Library Search (Wiley 275.L) รายงานผลเป็นชนิดและปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ เป็นพื้นที่ใต้กราฟ ($\times 10^6$)

1.3.3 ศึกษาโครงสร้างของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกผสม

1.3.3.1 โครงสร้างทางผลึกโดยใช้เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (X-ray powder diffraction, XRD)

วิเคราะห์โครงสร้างทางผลึกของตัวอย่างกระดูกปลาลูกผสมบีกผสมที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม ตรวจสอบลักษณะของพีคที่เกิดขึ้นที่เกิดจากการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ด้วย Copper radiation $K\alpha$ ศึกษาที่มุม 2θ ช่วงตั้งแต่ 10 – 80 องศา ใช้อัตราเร็วในการวิเคราะห์เท่ากับ 3 องศาต่อนาที และระบุด้วย peak profile เทียบกับข้อมูลมาตรฐาน JCPDF

1.3.3.2 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR ของกระดูกปลาลูกผสมบีกผสมที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม โดยนำตัวอย่างกระดูกปลาไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ในช่วงคลื่น 4000 – 400 cm^{-1}

1.3.3.3 การวิเคราะห์โครงสร้างสัณฐานวิทยา

วิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคโดยตรวจวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของกระดูกปลาจากกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม โดยนำผงตัวอย่างติดที่ขั้วบรอนซ์และเคลือบด้วยทองคำ (Sputter coater SPI-Module, West Chester, PA, USA) ก่อนส่องผ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) (JSM-5410LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) ที่ติดตั้ง electron-dispersive X-ray spectroscope (EDX) ด้วยแรงดันไฟฟ้าเร่ง 15 kV และใช้กำลังขยาย 1,500 เท่า

1.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD ตัวอย่าง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

ตอนที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะของไบโอแคลเซียม และแคลเซียมอนินทรีย์จาก กระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม

2.1 การเตรียมผงไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม และ แคลเซียมทางการค้า

เตรียมตัวอย่างผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามเช่นเดียวกับการเตรียม
ตัวอย่างผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามตอนที่ 1 ข้อที่ 1.2

เตรียมตัวอย่างแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม โดยนำกระดูกปลา
ลูกผสมบีกสยามที่ผ่านกระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูง (1) บดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดหินมิล
(Retsch ZM1000, Centrifugal Grinding Mill, Singapore) ก่อนนำไปเผาที่อุณหภูมิ 1,100 องศา
เซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง muffle furnace (Model 320, P Natertherm, Bremen,
Germany) จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh จะได้ผงแคลเซียมอนินทรีย์

แคลเซียมทางการค้า เตรียมโดยนำแคลเซียมอัดเม็ดยี่ห้อ Cal ups Join® ซึ่งเป็นแคบเซียม
ชนิดแคลเซียมคาร์บอเนต มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบด ก่อนนำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh
จะได้ผงแคลเซียมทางการค้า นำผงไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีก
สยาม และแคลเซียมทางการค้า ไปวิเคราะห์คุณลักษณะในขั้นตอนต่อไป

2.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะ

2.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis)

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผงไบโอแคลเซียม ผงแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลา
ลูกผสมบีกสยาม และผงแคลเซียมทางการค้า ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.3.2.1

2.2.2 วิเคราะห์ค่าสี

วิเคราะห์ค่าสีของผงไบโอแคลเซียม ผงแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม
และผงแคลเซียมทางการค้า ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1.2

2.2.3 วิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรตีน

วิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรตีนของผงไบโอแคลเซียม ผงแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูก
ปลาลูกผสมบีกสยาม และผงแคลเซียมทางการค้า ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.3.2.3

เวลา 2 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เตรียมกราฟมาตรฐานของ Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 50 - 600 ไมโครโมลาร์ รายงานผลในหน่วย $\mu\text{mol Trolox equivalent} / \text{g sample}$

2.2.5.3 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric reducing antioxidant power, FRAP)

ศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระของผงใบโอบคลเซียม ผงแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม และผงแคลเซียมทางการค้า วิเคราะห์ตามวิธีของ Benzie และ Strain (1996) เตรียม Stock Solution ของอะซิเตตบัพเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (pH 3.6) โดยการเติม 10 มิลลิโมลาร์ ของสารละลาย TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ใน HCl เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 มิลลิโมลาร์ และเตรียม working solution โดยการผสมอะซิเตตบัพเฟอร์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, TPTZ solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายโอบคลเซียม ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมด้วยสารละลาย working solution ปริมาตร 2850 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 50 - 600 ไมโครโมลาร์ รายงานผลในหน่วย $\mu\text{mol Trolox equivalent} / \text{g sample}$

2.2.5.4 ความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Metal chelating activity on ferrous ion (Fe^{2+}))

ศึกษาความสามารถในการจับโลหะเฟอร์รัสไอออนของผงใบโอบคลเซียม ผงแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม และผงแคลเซียมทางการค้า วิเคราะห์ตามวิธีของ Thiansilakul และคณะ (2007) ปิเปตสารละลายโอบคลเซียม ปริมาตร 2.35 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมกับ FeCl_2 ที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และ Ferrozine ที่มีความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำ Blank เช่นเดียวกันแต่จะใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง เตรียมกราฟมาตรฐาน EDTA ที่ระดับความเข้มข้น 0 - 50 ไมโครโมลาร์ และรายงานผลในหน่วย $\mu\text{mol EDTA equivalent} / \text{g sample}$

2.2.6 การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหาร (Bioavailability of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion)

วิเคราะห์การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหาร (*in vitro* gastrointestinal digestion method) ของไปโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลา ลูกผสมบิกสยาม และแคลเซียมทางการค้า โดยดัดแปลงวิธีของ Miller และคณะ (1981) ขั้นตอนจำลองการย่อยของกระเพาะอาหาร (Gastric digestion) โดยนำตัวอย่าง 1 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร และปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 1 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 6 M จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเปปซิน 3 มิลลิลิตร (เตรียมให้อยู่บนน้ำแข็งตลอดเวลาและใช้ทันทีโดยเตรียมจาก P-7000, from porcine stomach mucosa จำนวน 16 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.1M ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงและเขย่าตลอดเวลา (innova 4340, Illuminated refrigerated incubator shaker, USA) จากนั้นจำลองการย่อยและดูดซึมของลำไส้เล็ก (intestinal digestion) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยจากกระเพาะอาหารแล้วจำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 10M และ 1M ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.5 และเตรียมถุง dialysis (10,000 MWCO, SnakeSkin Dialysis Tubing, USA) ก่อนนำมาใช้โดยการนำไปต้มในน้ำเดือดที่มี EDTA เข้มข้น 0.001M จากนั้นบรรจุสารละลายต่างโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำถุง dialysis ที่เตรียมไว้ใส่ลงไปในฟลาสก์ที่มีตัวอย่างที่ผ่านการย่อยจากกระเพาะอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติมน้ำดีและน้ำดีจากตับอ่อนลงไปในฟลาสก์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (เตรียมให้อยู่บนน้ำแข็งตลอดเวลาและใช้ทันทีโดยเตรียมน้ำดีจากตับอ่อน P-1750, from porcine pancreas จำนวน 0.4 กรัม และน้ำดี B-8631, porcine จำนวน 2.5 กรัม ละลายในโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) จากนั้นบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่บรรจุอยู่ในถุง dialysis ไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม และฟอสฟอรัสด้วยเครื่อง Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES)

2.2.7 วิเคราะห์โครงสร้างทางสัณฐานวิทยา

วิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคโดยสัณฐานวิทยา นำตัวอย่างผงไบโอแคลเซียม ผงแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม และผงแคลเซียมทางการค้า ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.3.3.3

2.2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD ตัวอย่าง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

ตอนที่ 3 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามชนิดบรรจุแคปซูล

3.1 การเตรียมตัวอย่างไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล

สูตรผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลด้วยการเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต แคลเซียมแอสคอร์เบต และมอลโทเดกซ์ทริน ประกอบไปด้วย 4 สูตร แสดงดังตารางที่ 4 ได้แก่ สูตรที่ 1 ไบโอแคลเซียม (Bio-Ca) สูตรที่ 2 ไบโอแคลเซียมเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Bio-Ca + Col) สูตรที่ 3 ไบโอแคลเซียมเสริมวิตามินซี (Bio-Ca + Vit C) และสูตรที่ 4 ไบโอแคลเซียมเสริมคอลลาเจนผสมกับวิตามินซี (Bio-Ca + Col + Vit C) ทุกสูตรจะบรรจุในแคปซูลขนาด 500 มิลลิกรัมต่อแคปซูล

ตารางที่ 4 ส่วนผสมของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล

ส่วนผสมใน 1 แคปซูล (500 มิลลิกรัม)	สูตร			
	(1)	(2)	(3)	(4)
ไบโอแคลเซียม (Bio-Ca)	400	400	400	400
คอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Col)	0	100	0	50
แคลเซียมแอสคอร์เบต (Vit C)	0	0	100	50
มอลโทเดกซ์ทริน (MD)	100	0	0	0

3.2 วิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพของผลิตภัณฑ์

3.2.1 วิเคราะห์ค่าสี

วิเคราะห์ค่าสีของตัวอย่างไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามสูตรต่าง ๆ ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1.2

3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้

วิเคราะห์ความชื้นของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ ตามวิธีของ AOAC (2000) โดยนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดชั่งน้ำหนักที่แน่นอนใส่ในภาชนะลุมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำเข้าตู้อบแห้ง (FD56, Binder, China) อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักหลังอบ นำไปคำนวณหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างดังสมการ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}}$$

วิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ โดยนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (AQUA LAB, series 3 TE, U.S.A.)

3.2.3 วิเคราะห์ค่าความหนาแน่นรวม (Bulk density) และความหนาแน่นจำเพาะ (Tapped density)

วิเคราะห์ค่าความหนาแน่นรวม และค่าความหนาแน่นจำเพาะ ของผงไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Crowley และคณะ (2014) หาคความหนาแน่นปรากฏและความหนาแน่นจำเพาะ โดยการใส่ผงตัวอย่างลงในกระบอกตวงปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักของผงตัวอย่างแล้วคำนวณหาค่าความหนาแน่นรวม หลังจากนั้นนำกระบอกตวงไปเคาะ 150 ครั้ง จนมีปริมาตรคงที่ อ่านปริมาตรที่ได้ แล้วคำนวณความหนาแน่นจำเพาะ

$$\text{ค่าความหนาแน่นรวม (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{น้ำหนักผงตัวอย่าง}}{\text{ปริมาตร}}$$

$$\text{ค่าความหนาแน่นจำเพาะ (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{น้ำหนักผงตัวอย่าง}}{\text{ปริมาตรที่อ่านได้}}$$

3.2.4 วิเคราะห์ความสามารถในการละลาย

วิเคราะห์ความสามารถในการละลายของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ ที่ช่วงค่าพีเอช 1 - 10 ดัดแปลงจากวิธีของ ฐิตาภรณ์ (2554) โดยชั่งตัวอย่างผงไบโอแคลเซียมแต่ละสูตร 1 กรัม ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ช่วงค่าพีเอชต่าง ๆ (1 - 10) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใน

หลดบ่นเหวียง เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 30 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที เมื่อครบเวลาเขย่าให้เข้ากันอีกครั้งจึงนำไปปั่นเหวียงที่ 3000g เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสใส่ถ้วยอะลูมิเนียมที่แห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบอุ่นอย่างในตู้อบร้อนอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง แล้วคำนวณค่าการละลาย

$$\text{การละลาย (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็งที่เหลือหลังจากละลาย} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนละลาย}}$$

3.2.5 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์ความสามารถในการละลายของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.5

3.2.6 วิเคราะห์การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหาร (Bioavailability of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion)

วิเคราะห์การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหาร (*in vitro* gastrointestinal digestion method) ของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.6

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD ตัวอย่าง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

ตอนที่ 4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์บราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึกสยาม

4.1 การเตรียมตัวอย่างบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียม

ผลิตบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับต่าง ๆ ได้แก่ สูตรควบคุม (ไม่เติมผงไบโอแคลเซียม) และสูตรเสริมไบโอแคลเซียมร้อยละ 10 20 และ 30 ของน้ำหนักแป้ง โดยเริ่มจากร้อนของแห้งเข้าด้วยกัน ได้แก่ แป้งสาลี 27.5 กรัม เกลือ 0.2 กรัม ผงฟู 0.1 กรัม และผงไบโอแคลเซียม (ร้อยละ 10, 20, 30 ของน้ำหนักแป้ง) แล้วพักไว้ จากนั้นละลายดาร์คช็อคโกแลต 40 กรัม และเนยสด 15 กรัม โดยนำไปเข้าไมโครเวฟ (MS23F300EEK/ST, Samsung, Thailand) ใช้กำลังไฟ 600 วัตต์ เวลา 40 วินาที คนส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมน้ำตาลปนละเอียด 25 กรัม ผงโกโก้ 3

กรัม ผสมต่อจนเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้หัวตะกร้อด้วยเครื่องผสมอาหาร (EHM3407, Electrolux, Thailand) ใช้เวลา 2 นาที จากนั้นเติมกลีเซอรีน 1 กรัม นมสด 7.5 กรัม และน้ำ 3 กรัม ผสมต่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เวลา 2 นาที ตามด้วยส่วนผสมที่เป็นของแข็งลงไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยความเร็วต่ำ ใช้เวลา 3 นาที ก่อนเทลงถาดอะลูมิเนียมสำหรับอบ เกลี่ยให้มีความหนา 0.5 มิลลิเมตร แล้วนำเข้าเตาอบ (SMEG OV-E33, Pen K Inter Trading Co., Ltd., Thailand) โดยใช้ไฟบนและล่าง อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส นาน 12 นาที เมื่อครบเวลานำออกจากเตาอบแล้วตัดเป็นชิ้นขนาดกว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 7 เซนติเมตร ทันทีและพลิกกลับก่อนนำเข้าเตาอบต่ออีก 5 นาที เมื่อครบเวลานำออกจากเตาอบและทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนบรรจุลงถุงอะลูมิเนียมฟรอยด์ซิลให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 -23 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 2 วัน ก่อนทำการวิเคราะห์คุณภาพต่อไป

4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ

4.2.1 ค่าสี

วิเคราะห์ค่าสีของตัวอย่างบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมสูตรต่าง ๆ ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1.2

4.3 การวิเคราะห์ความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี

วิเคราะห์ความชื้นของบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับต่าง ๆ ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2

4.4 ลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัส

การวิเคราะห์คุณภาพทางเนื้อสัมผัส (Texture profile analyzer, TPA) ของบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับต่าง ๆ ดัดแปลงจากวิธีของ Benjakul และ Karnjanapratum (2018) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (CTX, Brookfield metek, UK) ที่อัตราการกด 10 มิลลิเมตร/วินาที ใช้แรงกด 50 kg โดยใช้หัวอะลูมิเนียมทรงมิด (HDP/90) เพื่อวิเคราะห์ความเปราะ (Fracturability) และระยะทางที่กดให้แตกหัก (Deformation at break)

4.5 การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัส

ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (9-Point Hedonic scale) คือ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด, 2 = ไม่ชอบมาก, 3 = ไม่ชอบปานกลาง, 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย, 5 = เฉย ๆ , 6 = ชอบเล็กน้อย, 7 = ชอบปานกลาง, 8 = ชอบมาก, 9 = ชอบมากที่สุด และใช้ผู้ทดสอบจำนวน 50 คน ช่วงอายุ 18 – 25 ปี

4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD ตัวอย่าง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การพัฒนากระบวนการผลิตและคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสม บีกสยาม

1. ร้อยละผลผลิต

การศึกษาการพัฒนากระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสม บีกสยาม เป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการแปรรูปปลาแล่นเนื้อแช่เยือกแข็ง โดยนำ (0) กระดูกปลาสดมาผ่านกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ คือ (1) กระบวนการฉีดย้ำแรงดันสูง (2) กระบวนการแช่น้ำต่าง (3) กระบวนการแช่ตัวทำลาย (4) กระบวนการฟอกสีและบด ได้เป็นผงไบโอแคลเซียมที่มีขนาดอนุภาค <math><100\text{ ไมโครเมตร}</math> (ภาพที่ 8) พบว่ากระดูกปลาสดที่ผ่านการฉีดย้ำด้วยเครื่องฉีดย้ำแรงดันสูงมีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 23.58 ± 5.06 หลังจากนั้นเมื่อนำมาผ่านกระบวนการต่าง ๆ จนถึงกระบวนการสุดท้ายได้เป็นผงไบโอแคลเซียมมีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 14.46 ± 2.66 (ตารางที่ 5) ซึ่งในระหว่างกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียม ส่วนประกอบของสารอินทรีย์ที่ติดอยู่กับกระดูกปลาลูกผสม บีกสยาม ได้แก่ เศษเนื้อ น้ำเลือด ไขมัน และไขกระดูก จะถูกกำจัดออกไปด้วยกระบวนการต่าง ๆ ข้างต้น จะทำให้กระดูกปลาสะอาดขึ้น และยังคงไว้ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ นอกจากนี้กระดูกแกนกลางของปลาลูกผสม บีกสยามมีขนาดชิ้นใหญ่ และยาวประมาณ 30 – 40 เซนติเมตร เมื่อผ่านกระบวนการต่าง ๆ จะทำให้กระดูกปลาเกิดความสูญเสียได้น้อยกว่ากระดูกปลาที่มีขนาดชิ้นเล็ก เป็นผลทำให้ได้ผงไบโอแคลเซียมที่มีค่าร้อยละผลผลิตที่สูง ซึ่งผงไบโอแคลเซียมมีสารประกอบอินทรีย์ที่สำคัญ ได้แก่ แคลเซียม และฟอสฟอรัส และจะอยู่ในรูปของผลึก ซึ่งผลึกแคลเซียมนี้จะอยู่ในรูปไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)) จัดเป็นสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับที่พบในกระดูกมนุษย์ (Best, et al., 2008) มีรายงานการผลิตผงแคลเซียมจากกระดูกปลาโม่ซึ่งเป็นปลาหนังน้ำจืดเช่นเดียวกัน พบว่ามีร้อยละผลผลิตแคลเซียมเท่ากับ 10.37 โดยลักษณะผงแคลเซียมที่ได้มีสีครีม จับตัวกันเป็นก้อน ไม่กระจายตัว และมีกลิ่นของคาวปลา (พรณทิพย์, 2555) ซึ่งต่างจากผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสม บีกสยามที่พบว่า มีสีขาวนวลบริสุทธิ์ เป็นผงละเอียด มีการกระจายตัวของผงไบโอแคลเซียมโดยไม่จับตัวกันเป็นก้อน ปราศจากกลิ่นเหม็นหืน และกลิ่นไม่พึงประสงค์

ตารางที่ 5 ร้อยละผลผลิตกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม

กระบวนการ	ร้อยละผลผลิต
(1) ฉีดน้ำแรงดันสูง	23.58 ± 5.06 ^{a**}
(2) แช่วสารละลายต่าง	17.25 ± 3.21 ^{ab}
(3) แช่ตัวทำละลายเอทานอล	15.29 ± 2.43 ^b
(4) ผงไปโอแคลเซียม	14.46 ± 2.66 ^b

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 9 กระดูกปลาลูกผสมบิกสยามเมื่อผ่านกระบวนการผลิตต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม

1.2 คำสี

คำสีของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียมแสดงดังตารางที่ 6 พบว่าเมื่อนำกระดูกปลาสดมาผ่านกระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูง เริ่มต้นจนกระทั่งถึงกระบวนการสุดท้าย คือ กระบวนการฟอกสี บด และร่อนเป็นผงไปโอแคลเซียม จะมีค่าความสว่าง (L^*) เพิ่มขึ้นเท่ากับ 48.68 ± 0.23 มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกพลาสติก อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) พบว่ากระดูกพลาสติกเมื่อนำมาผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จะมีผลทำให้ค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) ของผงไบโอแคลเซียมลดลง ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจากขั้นตอนการพัฒนากระบวนการผลิตผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกพลาสติกเริ่มต้นไปจนถึงกระบวนการสุดท้ายได้เป็นผงไบโอแคลเซียม พบว่าผงไบโอแคลเซียมที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพด้านสีที่ดีขึ้น (ภาพที่ 6) เพราะมีค่าความสว่าง (L^*) เพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับความขาวของผงไบโอแคลเซียมที่มีสีขาวเพิ่มขึ้นจากกระดูกสดเมื่อพิจารณาจากการสังเกตโดยในแต่ละขั้นตอนการผลิตมีผลทำให้สีของกระดูกปลามีความขาวเพิ่มมากขึ้น ตั้งแต่ขั้นตอนการแช่กระดูกปลาที่ผ่านการฉีดย้ำแรงดันสูงด้วยสารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นต่างแก่ ขั้นตอนนี้ต่างสามารถกำจัดโปรตีนและสิ่งตกค้างที่เหลืออยู่ โดยต่างจะละลายเศษเนื้อปลาที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบให้ออกจากกระดูกปลา เนื่องจากค่าพีเอชที่เป็นต่าง ($pH > 7$) ห่างจากค่าพีเอชที่จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point, pI) ของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา ($pI = 4.8$) ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบมากขึ้น โปรตีนจึงละลายได้มากขึ้นเช่นกัน (Batista, 1999) จึงทำให้กระดูกที่ไม่มีเศษเนื้อติดอยู่มีสีที่ขาวมากขึ้น และกระดูกปลาจะมีสีขาวเพิ่มขึ้นอย่างมากในขั้นการฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นองค์ประกอบที่ก่อปฏิกิริยาในสารฟอกสีกระดูก เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวออกซิไดซ์จะแพร่กระจายไปทั่วกระดูก และสร้างอนุมูลอิสระ (free radical) ที่ไม่เสถียรออกมาคือไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radicals (HO^\cdot)), เปอร์ไฮดรอกซิลเรดิคัล (perhydroxyl radicals (HOO^\cdot)), เปอร์ไฮดรอกซิลแอนไอออน (perhydroxyl anions (OO^\cdot)) และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anions) โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปมีผลกับโมเลกุลพันธะคู่ของรงควัตถุ (organic pigmented molecules หรือ chromophore molecules) คือ ฮีโมโกลบินที่เป็นรงควัตถุในเนื้อที่ติดกับกระดูกปลา พันธะคู่เหล่านี้จะแตกออกเป็นพันธะเดี่ยว จึงส่งผลให้โมเลกุลของรงควัตถุมีขนาดที่เล็กลงทำให้ความสามารถในการดูดซับแสงลดลง เกิดเป็นผลการฟอกสีกระดูก (bleaching effect) ทำให้กระดูกปลามีสีขาวและสว่างขึ้น (Spiro and Griffith, 1997) ส่วนขั้นตอนการกำจัดไขมันในกระดูกปลาโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล จะมีผลทำให้กระดูกปลามีสีขาวที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน เนื่องจากไขมันที่ยังหลงเหลืออยู่ในกระดูกปลาจะส่งผลต่อคุณภาพของผงไบโอแคลเซียมที่ผลิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไบโอแคลเซียม ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน จะได้สารประกอบกลุ่มอัลดีไฮด์และคาร์บอนิล ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาน้ำตาลโดยไม่ใช้เอนไซม์ ทำให้ผงไบโอแคลเซียมเปลี่ยนเป็นสีเหลือง มีกลิ่นหืน มีกลิ่นคาวปลา และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์สูงอีกด้วย อาจส่งผลทำให้ผงไบโอแคลเซียมไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นการใช้ตัวทำละลายเอทานอลในการกำจัดไขมันที่ตกค้างอยู่ในกระดูกปลาให้ออกมาจะทำให้มีค่าความสว่าง (L^*) สูงขึ้นเท่ากับ 48.57 ± 0.23 มีรายงานการใช้ตัวทำละลายเอทานอลกำจัดไขมันใน

กระบวนการสกัดโปรตีนไอโซเลตจากปลาเฮอริ่ง พบว่าโปรตีนไอโซเลตที่ได้มีปริมาณไขมัน และกลิ่นคาวปลาลดลงอย่างมากจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไอโซเลตที่ไม่ได้กำจัดไขมัน (Hoyle and Merritt, 1994) ดังนั้นการผลิตผงไปโอแคลเซียมที่ผ่านกระบวนการฉีดย้ำด้วยเครื่องฉีดย้ำแรงดันสูง การกำจัดโปรตีนด้วยสารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ การกำจัดไขมันด้วยตัวทำละลายเอทานอล และการฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำให้ได้ผงไปโอแคลเซียมมีลักษณะคุณภาพทางด้านกายภาพที่ดีขึ้น มีสีที่ขาวและสว่างขึ้น อีกทั้งยังสามารถกำจัดกลิ่นเหม็นหืน กลิ่นคาวปลา และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในผงไปโอแคลเซียมได้อีกด้วย

ตารางที่ 6 ค่าสีของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม

กระบวนการ	L*	a*	b*
(0) กระดูกปลาสด	36.19 ± 2.51 ^{*d**}	3.83 ± 0.11 ^a	17.67 ± 2.15 ^a
(1) ฉีดย้ำแรงดันสูง	43.04 ± 0.07 ^c	-1.09 ± 0.02 ^b	11.98 ± 0.02 ^b
(2) แช่สารละลายต่าง	46.56 ± 0.72 ^b	-1.10 ± 0.05 ^b	9.00 ± 0.33 ^c
(3) แช่ตัวทำละลายเอทานอล	48.57 ± 0.12 ^a	-1.25 ± 0.02 ^c	5.77 ± 0.07 ^d
(4) ผงไปโอแคลเซียม	48.68 ± 0.23 ^a	-1.45 ± 0.00 ^d	5.89 ± 0.04 ^d

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

1.3 องค์ประกอบทางเคมี

การพัฒนากระบวนการผลิตไปโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามขั้นตอนต่าง ๆ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของกระดูกปลา (ตารางที่ 7) ซึ่งการผลิตผงไปโอแคลเซียมด้วยกระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ การฉีดย้ำแรงดันสูง การแช่สารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ การแช่ตัวทำละลายเอทานอล และการแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนบดและร่อนให้เป็นผงไปโอแคลเซียม พบว่าค่าปริมาณความชื้นของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามทุกกระบวนการผลิตอยู่ในช่วงร้อยละ 1.4 – 4.7 และค่าปริมาณความชื้นมีแนวโน้มลดลง เมื่อนำกระดูกปลามาผ่านกระบวนการต่าง ๆ ผงไปโอแคลเซียมที่ได้จะมีค่าปริมาณความชื้นเท่ากับร้อยละ 1.42 ± 0.45 จัดอยู่ในเกณฑ์อาหารแห้ง ($a_w < 0.6$) ทำให้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนและไขมันของกระดูกปลาจะมีปริมาณลดลงระหว่างกระบวนการผลิตไปโอแคลเซียม

ด้วยเช่นกัน ซึ่งในขั้นตอนการแช่กระดูกปลาด้วยสารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นสารละลายต่างที่มีความสามารถในการกำจัดโปรตีน ทำให้สารละลายมีค่าพีเอชสูงและห่างจากค่าประจุสุทธิของโปรตีน หรือจุดไอโซอิเล็กทริก ($pI = 4.8$) ทำให้เศษเนื้อติดกระดูกที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมีประจุลบมากขึ้น เกิดการละลายทำให้เศษเนื้อหลุดออกจากกระดูกปลาทำให้ได้กระดูกปลาในขั้นตอนการแช่สารละลายต่างมีปริมาณโปรตีนลดลงเท่ากับร้อยละ 7.26 ± 0.10 เมื่อเทียบกับกระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูงซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 10.46 ± 0.96 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Idowu และคณะ (2020) ที่ศึกษากระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมและไฮดรอกซีอะพาไทต์จากโครงกระดูกปลาแชลมอนด้วยการแช่กระดูกปลาในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าการแช่กระดูกปลาในสารละลายต่างสามารถลดปริมาณโปรตีนโดยการกำจัดเศษเนื้อที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบออกจากโครงกระดูกปลาแชลมอนได้ และไม่มีผลในการละลายโปรตีนคอลลาเจนออกจากกระดูกปลา (Idowu et al., 2020) นอกจากนี้ปริมาณเถ้าที่พบในกระดูกปลาทุกขั้นตอนการผลิตไบโอแคลเซียมอยู่ในช่วงร้อยละ $46.77 \pm 2.86 - 68.98 \pm 3.60$ แสดงถึงปริมาณแร่ธาตุและสารประกอบอินทรีย์ทั้งหมดในกระดูกปลา จะเห็นได้ว่าเมื่อนำกระดูกปลาสดมาผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม พบว่าผงไบโอแคลเซียมจะมีปริมาณเถ้าสูงถึงร้อยละ 68.15 ± 3.60 เมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูงที่มีปริมาณเถ้าเท่ากับร้อยละ 46.77 ± 2.86 เนื่องจากในแต่ละขั้นตอนการผลิตไบโอแคลเซียมสามารถกำจัดสารประกอบอินทรีย์ออกไปจึงทำให้ผงไบโอแคลเซียมมีปริมาณสารประกอบอินทรีย์สูงตามปริมาณเถ้าที่เพิ่มมากขึ้น มีรายงานว่าไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าครีบน้ำเงิน มีปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้นลดลง แต่มีปริมาณเถ้าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกปลาสดเริ่มต้น (Benjakul et al., 2017) นอกจากนี้ ในขั้นตอนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าทองแถบ (skipjack tuna) มีการกำจัดไขมันออกจากกระดูกปลาเพื่อลดปริมาณกลิ่นหืน กลิ่นคาวปลา และกลิ่นไม่พึงประสงค์ในไบโอแคลเซียมด้วยตัวทำละลายเฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ทำให้ไขมันในไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าทองแถบมีค่าลดลง (Benjakul et al., 2017) แต่จากการทดลองคณะผู้วิจัยได้ใช้ตัวทำละลายเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งนิยมใช้ เนื่องจากเอทานอลจัดเป็นสารกลุ่มที่มีขั้วปานกลางทำให้สามารถสกัดสารที่มีขั้วและสารที่ไม่มีขั้วออกมาจากกระดูกปลาได้ ซึ่งเอทานอลมีความสามารถในการทำละลายสารได้กว้างขวาง ไม่เป็นพิษ และมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น (Baümler et al., 2016) ดังนั้นการใช้ตัวทำละลายเอทานอลในกระบวนการผลิตผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามมีผลทำให้ผงไบโอแคลเซียมมี

ปริมาณไขมันลดลง ส่งผลให้ไบโอแคลเซียมที่ได้ไม่มีกลิ่นคาวปลา กลิ่นเหม็นหืน และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม

กระบวนการ	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
(1) ฉีดน้ำแรงดันสูง	4.70 ± 0.46 ^{a**}	10.46 ± 0.96 ^a	2.46 ± 0.07 ^a	46.77 ± 2.86 ^c
(2) แช่วสารละลายต่าง	3.33 ± 0.80 ^{ab}	7.26 ± 0.10 ^b	1.93 ± 0.09 ^b	59.54 ± 3.71 ^b
(3) แช่วตัวทำละลายเอทานอล	3.11 ± 0.43 ^b	6.17 ± 0.18 ^c	0.13 ± 0.03 ^c	63.99 ± 2.90 ^{ab}
(4) ผงไบโอแคลเซียม	1.42 ± 0.45 ^b	2.86 ± 0.13 ^d	0.07 ± 0.03 ^d	68.15 ± 3.60 ^a

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

1.4 ปริมาณแร่ธาตุและโลหะหนัก

ปริมาณแร่ธาตุและโลหะหนักชนิดต่าง ๆ ของกระดูกปลาสด และผงไบโอแคลเซียมจากปลาลูกผสมบิกสยาม แสดงดังตารางที่ 8 จากผลการทดลองพบว่าผงไบโอแคลเซียมมีปริมาณแร่ธาตุแคลเซียม (Ca) และฟอสฟอรัส (P) มากกว่าตัวอย่างกระดูกปลาสด ซึ่งผลการทดลองข้างต้นมีความสอดคล้องกับปริมาณเถ้าของผงไบโอแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นจากกระดูกปลาสดเริ่มต้น (ตารางที่ 7) Jafarpour และคณะ (2020) ศึกษาปริมาณแคลเซียม และฟอสฟอรัสจากผงแคลเซียมจากกระดูกปลาสด เมื่อนำกระดูกปลาสดมาผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นผงแคลเซียมจะทำให้ได้ผงแคลเซียมที่มีปริมาณแคลเซียม และฟอสฟอรัสสูงขึ้น (Jafarpour et al., 2020) โดยทั่วไปองค์ประกอบของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยสารประกอบอินทรีย์ และสารอินทรีย์ ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ที่สำคัญ เช่น โปรตีน และไขมัน ซึ่งโปรตีนจะถูกกำจัดออกไปในขั้นตอนการแช่กระดูกปลาในสารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และไขมันถูกกำจัดออกไปด้วยการแช่ในตัวทำละลายเอทานอล ส่วนสารประกอบอินทรีย์หรือแร่ธาตุสำคัญหลักที่พบในกระดูกปลาสด คือแคลเซียมและฟอสฟอรัสซึ่งพบในปริมาณร้อยละ 15.54 ± 0.37 และ 0.63 ± 0.01 ตามลำดับ ส่วนแร่ธาตุสำคัญหลักที่พบในผงไบโอแคลเซียม คือ แคลเซียมและฟอสฟอรัสเช่นเดียวกัน ซึ่งพบในปริมาณร้อยละ 24.84 ± 0.39 และ 1.00 ± 0.01 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณแคลเซียมที่พบในกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามนี้มีปริมาณน้อยกว่าแคลเซียมจากกระดูกปลาทะเล เช่น ปลาสดพบร้อยละ 29.70 – 58.30 (Jafarpour et al., 2020) ปลาแชลมอนพบร้อยละ 27.30 – 38.84 (Idowu et

al., 2020) กระจกปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบพบร้อยละ 14.00 – 23.02 (Benjakul et al., 2017) อย่างไรก็ตามปริมาณแคลเซียมที่ต่างกันในกระจกปลาจะขึ้นอยู่กับชนิดปลา อายุ และอาหารที่ใช้เลี้ยง (ณัฐธิดา, 2552) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในกระจกปลาสด และผงไปโอแคลเซียมจากกระจกปลาลูกผสมบึงสยาม พบว่ากระจกปลาสดและผงไปโอแคลเซียมไม่พบการปนเปื้อนของโลหะหนัก ได้แก่ พรอท ตะกั่ว และสารหนู เป็นต้น ทำให้ผงไปโอแคลเซียมผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๕๕) พ.ศ. ๒๕๕๖ เรื่อง อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (กระทรวงสาธารณสุข, 2549) ที่ระบุว่าอาหารแปรรูปต้องมีปริมาณโลหะหนัก ตะกั่ว (Pb) ไม่เกิน 1 mg/kg สารหนู (As) ไม่เกิน 2 mg/kg และพรอท (Hg) ไม่เกิน 0.5 mg/kg ซึ่งปลาลูกผสมบึงสยามผ่านการเลี้ยงจากฟาร์มที่มีมาตรฐานทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ดี (Good Aquaculture Practice; GAP) ซึ่งบ่อเลี้ยงอยู่ห่างไกล และไม่ได้รับผลกระทบจากแหล่งเกิดมลพิษ มีระบบการถ่ายเทน้ำที่ดี มีการจัดการระบบน้ำทิ้งจากครีวเรือนแยกจากระบบบ่อเลี้ยง มีการจัดเก็บขยะที่ดีไม่มีโอกาสปนเปื้อนเข้าสู่ระบบเลี้ยง มีบันทึกข้อมูลและปฏิบัติตามคู่มือการเลี้ยงสัตว์น้ำที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ ตลอดจนการเลือกใช้ลูกพันธุ์ที่แข็งแรงไม่เป็นโรค จึงทำให้ได้มาซึ่งปลาลูกผสมบึงสยามที่มีคุณภาพดี รวมถึงไม่พบว่ามีสารปนเปื้อนโลหะหนักที่เป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค

ตารางที่ 8 ปริมาณแร่ธาตุและโลหะหนักชนิดต่าง ๆ ของกระดุกพลาสติก และผงไปโอแคลเซียมจากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยาม

แร่ธาตุ (g/100g sample)	ตัวอย่าง	
	กระดุกพลาสติก	ผงไปโอแคลเซียม
Ca	15.54 ± 0.37 ^{*b**}	24.84 ± 0.39 ^a
P	0.630 ± 0.01 ^b	1.000 ± 0.01 ^a
Fe	0.042 ± 0.00 ^a	0.002 ± 0.00 ^b
Cu	0.001 ± 0.00 ^a	ND
Zn	0.005 ± 0.00 ^b	0.006 ± 0.00 ^a
Sn	ND	ND
Hg	ND	ND
Pb	ND	ND
As	ND	ND

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

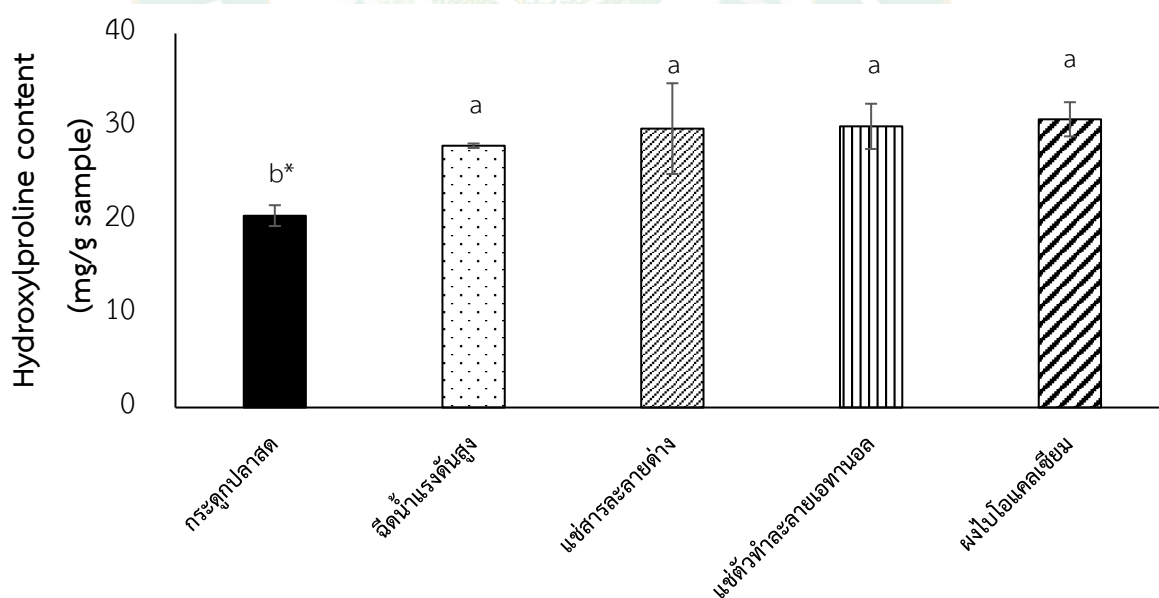
** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ND = ไม่พบ

1.5 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของกระดุกปลาอุกผสมบีกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม แสดงดังภาพที่ 9 จากการทดลองพบว่าปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของกระดุกปลาจากกระบวนการต่าง ๆ มีค่าเพิ่มขึ้นจากกระดุกพลาสติกเริ่มต้น เนื่องจากเมื่อนำกระดุกพลาสติกเริ่มต้นมาผ่านกระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูง แชน้ำต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ แชน้ำทำละลายเอทานอล จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียมในขั้นตอนสุดท้าย มีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนเท่ากับ 20.52 ± 1.11 28.00 ± 0.24 29.83 ± 4.85 30.07 ± 2.42 และ 30.82 ± 1.83 mg/g sample ตามลำดับ ซึ่งกระดุกพลาสติก พบว่ามีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนน้อยที่สุด ($p \leq 0.05$) เนื่องจากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยามสด ภายหลังจากกระบวนการแล่นเนื้อยังคงมีสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น เนื้อเลือด เอ็น ไขมัน เป็นต้น ปะปนอยู่ทำให้พบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในกระดุกสดที่ติดเนื้อปริมาณที่น้อย แต่เมื่อนำกระดุกปลาสดมาผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียมจะทำให้กระดุกปลามีปริมาณสารอินทรีย์ข้างต้นลดลง และเหลืออยู่ในปริมาณที่น้อยมาก ๆ จึงทำให้พบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในกระดุกปลาจากกระบวนการต่าง ๆ ในปริมาณที่สูงขึ้นกว่ากระดุกพลาสติก

ซึ่งไฮดรอกซีโพรลีนเป็นกรดอะมิโนที่พบเฉพาะในคอลลาเจน และมีหมู่อิมีโน (imino group) มีบทบาทสำคัญต่อความคงตัวของเกลียวสามสายของคอลลาเจน (Burjanadeza, 2000) โดยจะป้องกันการหมุนของพันธะหรือโครงสร้างคอลลาเจน เนื่องจากไฮดรอกซีโพรลีนมีตำแหน่งไฮดรอกซิลที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนและวงแหวน pyrrolidine (Schumacher, 2006) ดังนั้นการพบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในผงไบโอแคลเซียมเป็นหลักฐานบ่งชี้ว่าผงไบโอแคลเซียมยังคงมีคอลลาเจนหลงเหลืออยู่ เนื่องจากไฮดรอกซีโพรลีนเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนโพรลีน (Proline) จะพบได้เฉพาะในคอลลาเจนและเจลาตินเท่านั้น นอกจากนี้กระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมในขั้นตอนการแช่สารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จะไม่มีผลต่อการกำจัดโปรตีนคอลลาเจนในกระดุกปลา โดยสารละลายต่างเป็นสารเคมีที่ได้รับความนิยมใช้ในขั้นตอนเริ่มต้นในการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน ในกระบวนการผลิตคอลลาเจนและเจลาตินจากหนังและกระดุกปลา (Idowu et al., 2020) ซึ่งคอลลาเจนสามารถละลายได้ดีในสารละลายกรดแต่ไม่ละลายในสารละลายต่าง (Li et al., 2013) อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังแสดงให้เห็นอีกว่ากระดุกปลาที่ผ่านกระบวนการแช่ตัวทำละลายเอทานอล การฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และการบดเป็นผงไบโอแคลเซียม ไม่มีผลทำให้ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนเปลี่ยนแปลง ($p>0.05$) ดังนั้นผงไบโอแคลเซียมจากกระดุกปลาลูกผสมบิกสยามที่ได้จากกระบวนการผลิตข้างต้นยังคงอุดมไปด้วยคอลลาเจน และอาจรวมถึงสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ อีกด้วย

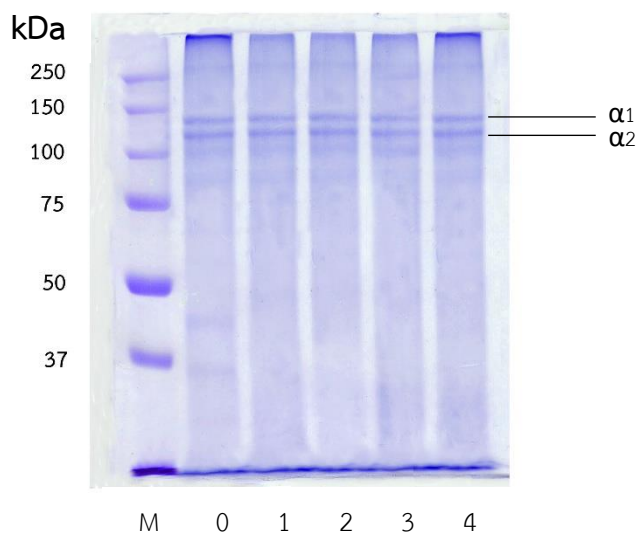


ภาพที่ 10 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของกระดุกปลาลูกผสมบิกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม

หมายเหตุ : * ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันบนแท่งกราฟมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq 0.05$)

1.6 รูปแบบโปรตีน

การศึกษาารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จากกระดุกปลาอุกผสมบิกสยาม ในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม แสดงดังภาพที่ 10 พบรูปแบบโปรตีนจากกระดุกปลาที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม ปรากฏแถบโปรตีนจำนวนสองแถบ ที่ตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 133 และ 116 kDa ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ogawa และคณะ (2004) ที่ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนคอลลาเจนจากกระดุกปลาจากปลากระพงและปลาซีฟส์เฮด พบว่าคอลลาเจนที่พบในกระดุกปลาดังกล่าวเป็นคอลลาเจน type I ประกอบไปด้วยสายโซ่แอลฟา 2 สาย คือ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ น้ำหนักโมเลกุล 130 และ 110 kDa ตามลำดับ ซึ่งคอลลาเจน type I เป็นคอลลาเจนไฟบริลลาร์ที่สำคัญ พบได้ในอวัยวะส่วนใหญ่ (Saito et al., 2001) และยังเป็นคอลลาเจนชนิดแรกที่แยกออกจากองค์ประกอบด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Sato et al., 1988) Li และคณะ (2013) รายงานว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดจากกระดุกและหนังของปลาอินทรีประกอบด้วยคอลลาเจน type I ซึ่งเป็น heterotrimer ที่มีสายโซ่แอลฟา 2 สาย ($\alpha 1$ และ $\alpha 2$) นอกจากนี้ปวเรศวร์ และนลินรัตน์ (2558) ศึกษาารูปแบบโปรตีนคอลลาเจนการหนังปลานิล พบว่าเป็นคอลลาเจน type I และมีโครงสร้างแบบเกลียวสามสาย ดังนั้นจากผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นว่าแถบโปรตีนที่พบในกระดุกปลาอุกผสมบิกสยาม ที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม คือ คอลลาเจน type I ที่ประกอบด้วยสายโซ่ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ซึ่งเป็นคอลลาเจนส่วนใหญ่ที่พบในส่วนของหนัง เอ็น และกระดุกในสัตว์ชั้นสูง (Akiyama et al., 2021)



ภาพที่ 11 รูปแบบโปรตีน (SDS – PAGE) ของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม
 หมายเหตุ : M = โปรตีนมาตรฐาน, 0 = กระดูกปลาสด, 1 = ฉีดน้ำแรงดันสูง, 2 = แห่สารละลายต่าง, 3 = แห่ตัวทำละลายเอทานอล, 4 = ผงไบโอแคลเซียม

1.7 องค์ประกอบกรดอะมิโน

ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกปลาสด และผงไบโอแคลเซียม จากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามแสดงดังตารางที่ 9 พบว่า กระดูกปลาสด และผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยาม อุดมไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็นครบทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ Threonine (Thr), Valine (Val), Methionine (Met), Isoleucine (Ile), Leucine (Leu), Phenylalanine (Phe), Lysine (Lys) และ Tryptophan (Trp), Histidine (His) และ Arginine (Arg) นอกจากนี้ยังพบว่า ผงไบโอแคลเซียมมีปริมาณกรดอะมิโน Proline (Pro), Glycine (Gly) และ Arginine (Arg) สูงกว่ากระดูกปลาสดเล็กน้อย ($p \leq 0.05$) ซึ่งกรดอะมิโน Glycine (Gly), Alanine (Ala) และ Proline (Pro) ที่ตรวจพบในกระดูกปลาสดและไบโอแคลเซียมสามารถบ่งชี้ได้ว่าไบโอแคลเซียมมีโปรตีนคอลลาเจนหลงเหลืออยู่ (de Paz-Lugo et al., 2018) ซึ่งมีรายงานว่า Glycine (Gly) เป็นกรดอะมิโนขนาดเล็กซึ่งพบมากที่สุดไนโปรตีนคอลลาเจนโดยพบมากถึงร้อยละ 33 นอกจากนี้ Glycine (Gly) มีบทบาทสำคัญในโปรตีนโครงสร้างของคอลลาเจน อีกทั้งยังพบว่าเป็นส่วนประกอบของคอลลาเจนซึ่งอยู่ในทุกตำแหน่งที่ 3 ของสายโซ่ α' ของคอลลาเจน (Chhum et al., 2016) ดังนั้นจากการตรวจพบกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโน Proline (Pro) และ Glycine (Gly) แสดงให้เห็นว่าไบโอแคลเซียมอุดมไปด้วยสารประกอบอินทรีย์ที่สำคัญ คือคอลลาเจนเปปไทด์ และโปรตีนชนิดอื่น ๆ มีรายงานว่า Toppe และคณะ (2007) ศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนในกระดูกจากปลาแมคเคอเรล ปลาเทราต์ และปลาเฮอรริ่ง พบว่า

กระดูกปลาทั้ง 3 ชนิด มีองค์ประกอบกรดอะมิโนที่อุดมไปด้วย Glycine (Gly), Glutamine (Glu), Arginine (Arg), Proline (Pro) และ Asparagine (Asn) ในขณะที่กระดูกปลาคอด (*Gadus morhua*) พบว่ามีองค์ประกอบกรดอะมิโนเช่นเดียวกับปลาทั้ง 3 ชนิด ข้างต้นแต่ไม่พบ Tryptophan (Trp) (Jafarpour et al., 2020) ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่พบในกระดูกปลาสดและผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามมีปริมาณที่มีแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมขั้นตอนต่าง ๆ จะส่งผลทำให้พบปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ มีการเปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการแช่กระดูกปลาในสารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งขั้นตอนนี้สามารถกำจัดโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกไป โดยสารละลายต่างจะทำโมเลกุลของโปรตีนมีประจุลบมากขึ้น และมีประจุสุทธิห่างจากจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, pI) ของโปรตีนจึงทำให้เศษเนื้อปลาที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบละลายออกจากกระดูกมากขึ้น อาจส่งผลทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณกรดอะมิโนไปกับเศษเนื้อที่ติดกับกระดูกปลา (Benjakul et al., 2017) ทำให้พบปริมาณของกรดอะมิโน Glycine (Gly), Alanine (Ala), Proline (Pro) และปริมาณ Hydroxyproline (Hyp) (ภาพที่ 7) ในผงไบโอแคลเซียมสูงกว่ากระดูกปลาสดเริ่มต้น ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Idowu และคณะ (2020) ที่ศึกษาการผลิตและองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในไบโอแคลเซียมจากโครงกระดูกปลาแซลมอน พบว่าไบโอแคลเซียมจากโครงกระดูกปลาแซลมอนมีกรดอะมิโน Glycine (Gly) เป็นองค์ประกอบหลักแต่ไม่พบ Aspartic acid (Asp) นอกจากนี้ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพบว่ามีกรดอะมิโน Glycine (Gly) เป็นองค์ประกอบหลักเช่นกันแต่ไม่พบ Cystine (Cys) (Benjakul et al., 2017) เช่นเดียวกับการสกัดคอลลาเจนจากกระดูกและเกล็ดปลาจวด (*Pogonia cromis*) และปลา sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*) โดยใช้สารละลายต่าง พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้มีกรดอะมิโน Proline (Pro), Glycine (Gly) และ Alanine (Ala) ที่เป็นกรดอะมิโนหลักที่ตรวจพบ และเป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคอลลาเจน (Ogawa et al., 2004)

ตารางที่ 9 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกปลาสด และผงไปโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึงสยาม

กรดอะมิโน (g/100 g)	กระดูกปลาสด	ผงไปโอแคลเซียม
Aspartic acid	17.35 ± 0.22 ^{*a**}	16.87 ± 0.06 ^b
Threonine	8.32 ± 0.09 ^a	7.73 ± 0.36 ^b
Serine	11.06 ± 0.22 ^a	10.03 ± 0.03 ^b
Glutamic acid	28.18 ± 0.43 ^a	27.08 ± 0.16 ^b
Proline	29.64 ± 0.36 ^b	30.62 ± 0.04 ^a
Glycine	60.83 ± 0.68 ^b	65.07 ± 1.33 ^a
Alanine	25.41 ± 0.28 ^a	25.68 ± 0.24 ^a
Cystine	1.42 ± 0.02 ^a	0.83 ± 0.09 ^b
Valine	7.32 ± 0.06 ^a	6.68 ± 0.14 ^b
Methionine	3.30 ± 0.02 ^a	2.18 ± 0.30 ^b
Isoleucine	4.83 ± 0.05 ^a	4.20 ± 0.11 ^b
Leucine	10.30 ± 0.19 ^a	8.34 ± 0.05 ^b
Tyrosine	3.41 ± 0.03 ^a	2.40 ± 0.05 ^b
Phenylalanine	6.41 ± 0.10 ^a	5.49 ± 0.03 ^b
Histidine	3.08 ± 0.03 ^a	1.19 ± 0.01 ^b
Lysine	10.37 ± 0.13 ^a	8.63 ± 0.04 ^b
Arginine	19.76 ± 0.19 ^a	19.72 ± 0.02 ^b
Tryptophan	0.50 ± 0.00 ^a	0.13 ± 0.09 ^b

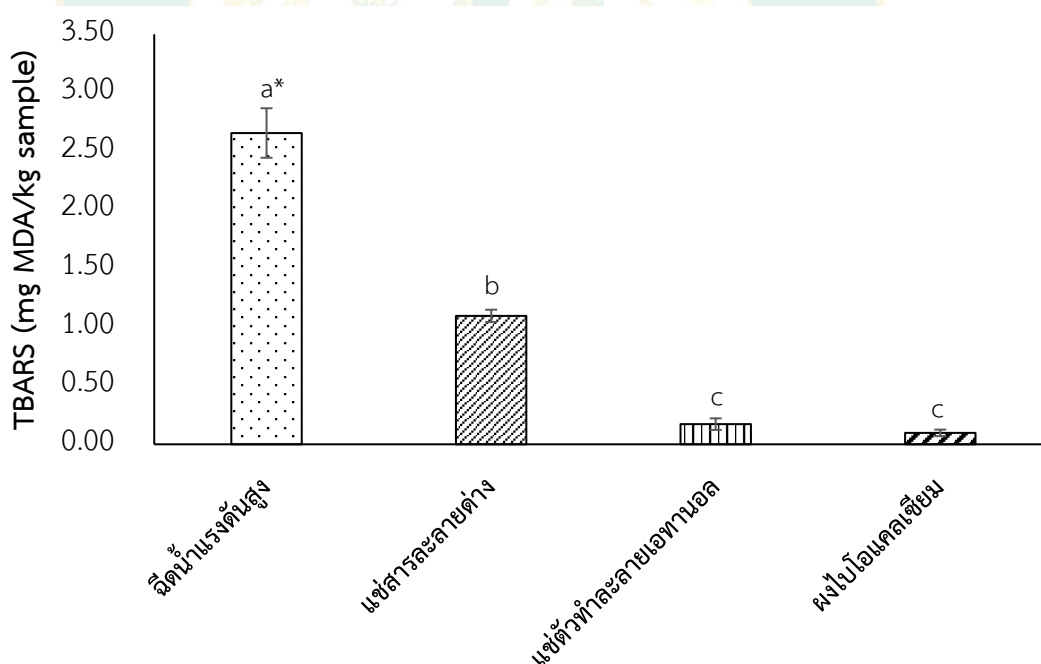
หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

1.8 การเกิดออกซิเดชันของไขมัน

ค่าการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันวัดด้วยวิธี Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) ของกระดูกปลาลูกผสมบึงสยามเมื่อผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียมแสดงดังภาพที่ 11 พบว่าค่า TBARS ของกระดูกปลาจากกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ มีแนวโน้มลดลงจากกระดูกปลาสดเริ่มต้น ซึ่งขั้นตอนการล้างกระดูกปลาด้วยเครื่องฉีดน้ำแรงดันสูงจนถึงขั้นตอนสุดท้ายที่ได้ผงไปโอแคลเซียมมีค่า TBARS ลดลงจาก 2.66 ถึง 0.1 mg

MDA/kg sample ตามลำดับ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันเป็นสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ในอาหารทุกชนิดที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบรวมไปถึงวัตถุดิบเริ่มต้น หากไม่มีการกำจัดไขมันออกจากอาหารอาจจะทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน และกลิ่นไม่พึงประสงค์รวมถึงการเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับจากผู้บริโภค ซึ่งค่า TBARS เป็นค่าที่บ่งบอกเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันขั้นที่สอง (secondary product) ซึ่งจะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่ระเหยได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันคือ สารกลุ่มอัลดีไฮด์ ซึ่งมีกลิ่นเหม็นหืน และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ พบว่ากระดุกปลาลูกผสมบิกสยามที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ มีแนวโน้มการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งขั้นตอนการกำจัดไขมันออกจากกระดุกปลาด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะทำให้ค่า TBARS ลดลงอย่างมาก เนื่องจากผลิตภัณฑ์ไม่มีไขมันหรือสารตั้งต้นของเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งสอดคล้องกับค่า TBARS และกลิ่นหืนของไบโอแคลเซียมจากปลาหูฉลามที่ผ่านการทดสอบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่ได้รับการฝึกฝน ซึ่งพบว่าไบโอแคลเซียมมีค่า TBARS ลดลง และผู้ทดสอบที่ได้รับการฝึกฝนตรวจพบว่าไบโอแคลเซียมมีกลิ่นหืนลดลงเช่นกันเมื่อเทียบกับกระดุกปลาสดเริ่มต้น (Benjakul et al., 2017)



ภาพที่ 12 ค่า Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) ของกระดุกปลาลูกผสมบิกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม
 หมายเหตุ : * ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันบนแท่งกราฟมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

1.9 ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ

ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ของกระดุกปลาถูกผสมบีกสยามภายหลังแต่ละกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียมแสดงดังตารางที่ 10 พบว่าสารประกอบที่ระเหยได้ที่ตรวจพบในตัวอย่างกระดุกปลาทุกกระบวนการผลิต และผงไปโอแคลเซียมสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ อัลดีไฮด์ คีโตน แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และอื่นๆ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม กระดุกปลาถูกผสมบีกสยามมีปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้กลุ่มต่าง ๆ ลดลง เมื่อผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียมในขั้นตอนสุดท้าย เนื่องจากในกระบวนการผลิตได้มีการกำจัดโปรตีนออกจากกระดุกปลาโดยใช้สารละลายต่าง ตามด้วยการกำจัดไขมันโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล และการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการฟอกสีกระดุกปลา จึงทำให้ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้กลุ่มต่าง ๆ ลดลงจากกระดุกสดเริ่มต้นเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบที่ระเหยได้ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งสารประกอบที่ระเหยได้ที่พบมากที่สุด ตัวอย่างกระดุกปลาสดเริ่มต้นดังกล่าวเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มอัลดีไฮด์ และกรดอินทรีย์ เช่น benzaldehyde และ hexanoic acid เป็นต้น จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่ามีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (TBARS) ในตัวอย่างกระดุกปลาถูกผสมบีกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม (ภาพที่ 11) โดยพบว่ากระดุกปลาสดเริ่มต้นมีค่า TBARS สูงกว่าตัวอย่างอื่น เนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในขั้นต้น (innitiation) และขั้นเพิ่มจำนวน (propagation) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารประกอบที่ระเหยได้ ซึ่งเป็นสารกลุ่มอัลดีไฮด์ และคีโตน (Thomas, 1971) Benjakul และคณะ (2017) รายงานว่าไปโอแคลเซียมจากกระดุกปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบ (skipjack tuna) ที่ผลิตจากกระดุกปลาทูน่าหนึ่ง มีปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้มีแนวโน้มลดลงเมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ ได้แก่ การฉีบน้ำแรงดันสูง การแช่สารละลายต่าง การแช่ตัวทำละลายเฮกเซน และการฟอกสีด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ตามด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และบดให้เป็นผงไปโอแคลเซียม แต่ไม่พบสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในไปโอแคลเซียม (Benjakul et al., 2017) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ในตัวอย่างกระดุกปลาถูกผสมบีกสยามทุกกระบวนการ พบว่าสารประกอบที่ระเหยได้ที่พบมากที่สุด คือ Benzaldehyde ตามด้วย Nonanal และ Hexanal แต่จะพบว่ามีปริมาณลดลงเมื่อนำกระดุกปลาผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ ถึงกระบวนการสุดท้ายจนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม โดยสารประกอบที่ระเหยได้ทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มอัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในอาหาร (Ross and Smith, 2006) อย่างไรก็ตามสาร Hexanal จะมีกลิ่นที่เฉพาะตัวคือกลิ่นหืน (Rancid) ที่มีกลิ่นคล้ายกับหญ้าหรือหญ้าสด (Grassy or fresh green aroma) ซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในผลิตภัณฑ์อาหาร (Fu et al., 2020) นอกจากนี้

Sae-Laew และ Benjakul (2015) ยังรายงานอีกว่า Hexanal และ Nonanal เป็นสารประกอบที่ระเหยได้หลักที่พบในการสกัดเจลาตินจากหนังปลากระพงขาว ดังนั้นกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาอุกผสมบีกสยามด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ได้แก่ การฉีดน้ำแรงดันสูง การแช่น้ำต่าง โฟแทสเซียมไฮดรอกไซด์ การแช่ตัวทำละลายเอทานอล และการฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ก่อนบดให้เป็นผงไบโอแคลเซียม สามารถกำจัดหรือลดปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ในกระดูกปลาอุกผสมบีกสยามได้ ซึ่งส่งผลดีในด้านการลดกลิ่นเหม็นหืน กลิ่นคาวปลา และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในผงไบโอแคลเซียมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียม



ตารางที่ 10 ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ของกระดุกปลาอุกผสมบีกสยามในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม

สารประกอบที่ระเหยได้	ตัวอย่าง				
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)
Aldehydes					
Dimethyl ether	2.40	ND	ND	ND	ND
Pentanal	2.24	ND	ND	ND	ND
Hexanal	15.74	14.73	13.94	17.38	15.60
Octanal	2.69	1.89	ND	3.20	2.68
Heptenal	2.51	2.69	3.38	ND	2.12
Nonanal	15.96	9.31	7.12	24.63	17.92
Benzaldehyde	40.09	26.85	20.08	36.07	37.75
Ketones					
3-Octanone, 2-methyl-	1.93	ND	ND	ND	ND
Alcohols					
1-Penten-3-ol	2.56	3.61	3.29	ND	ND
1-Hexanol	3.73	5.35	5.59	3.01	4.78
1-Octen-3-ol	12.80	17.12	14.84	19.76	18.57
Benzyl alcohol	3.58	1.39	1.65	ND	1.60
Acids					
Formic acid, octyl ester	14.82	24.26	31.42	0.00	29.61
Hexanoic acid, anhydride	2.68	1.88	ND	ND	ND
Pentanoic acid	7.49	ND	ND	ND	ND
Acetic acid, phenylmethly ester	3.53	6.87	40.52	ND	11.14
Hexanoic acid	17.74	19.66	2.24	ND	ND
Heptanoic acid	4.30	4.16	ND	ND	ND
Octanoic acid	4.39	5.58	ND	ND	ND
Nonanoic acid	4.66	5.61	ND	ND	ND
Others					
Phenol	2.37	ND	ND	ND	ND
2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	3.30	ND	5.89	0.00	2.45
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	2.66	ND	ND	4.90	3.76

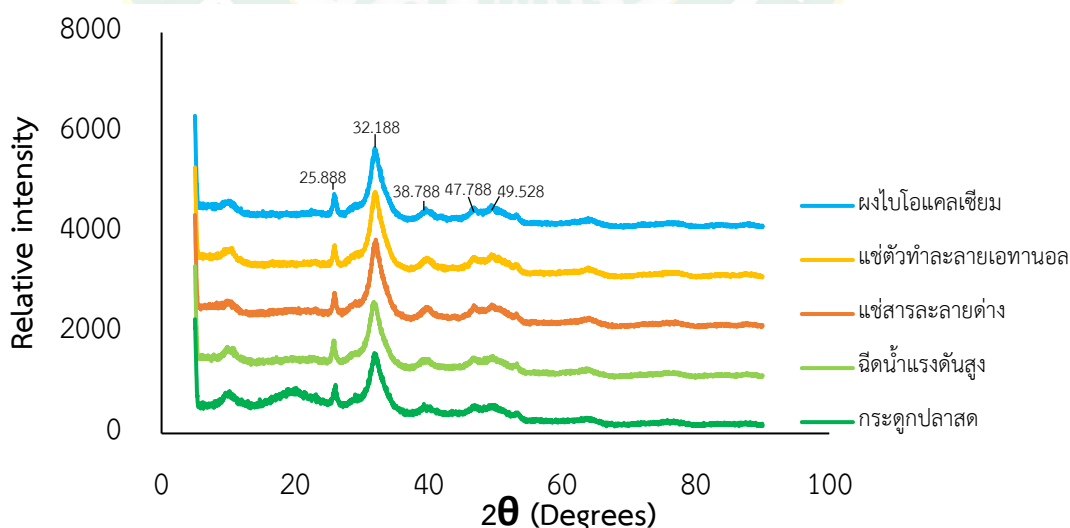
หมายเหตุ : 0 = กระดุกปลาสด, 1 = ฉีดน้ำแรงดันสูง, 2 = แช่วสารละลายต่าง, 3 = แช่วตัวทำละลายเอทานอล, 4 = ผงไปโอแคลเซียม

ค่าที่แสดงเป็นพื้นที่ใต้กราฟ ($\times 10^6$)

ND = ไม่พบ

1.10 โครงสร้างทางผลึก โดยใช้เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (X-ray powder diffraction, XRD)

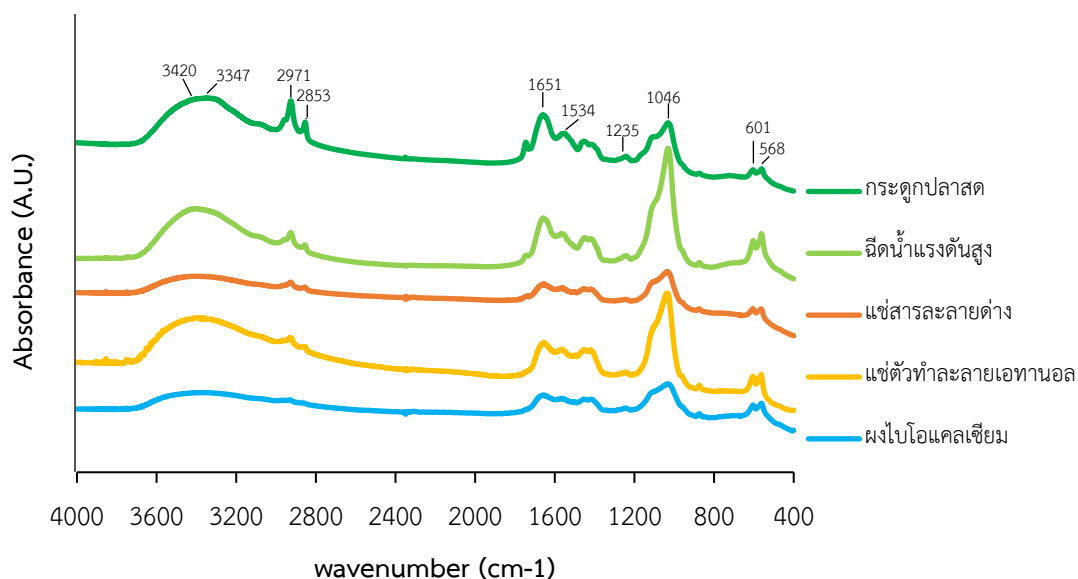
จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางผลึกของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียมโดยใช้เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (X-ray powder diffraction, XRD) จากภาพที่ 12 จากผลการทดลองพบว่ากระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ พบมุมกระเจิงของรังสีเอกซ์ที่ตำแหน่ง 25.888, 32.188, 39.788, 47.788, 49.528 และ 53.208 ซึ่งตรงกันกับผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), HA) ในฐานข้อมูล (JCPDF: 01-084-1998) ซึ่งมีโครงสร้างผลึกแบบ Hexagonal (Piccirillo et al., 2013) มีรายงานว่าเมทริกซ์ในกระดูกปลาเริ่มต้นจะเปลี่ยนแปลงเป็นผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ เนื่องมาจากการสร้างนิวเคลียสและการขยายตัวของนาโนคริสตัลแบบ Hexagonal – dipyramidal ในอนุภาคภายใต้อุณหภูมิสูง (Benjakul et al., 2017) ผงแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ (skipjack tuna) ที่เตรียมโดยวิธีการเผาที่อุณหภูมิ 1,100 องศาเซลเซียส มีค่าร้อยละการเกิดผลึก (% Crystallinity) ของไฮดรอกซีอะพาไทต์สูงกว่ากระดูกเริ่มต้น (Benjakul et al., 2017) Benjakul และคณะ (2017) ศึกษาคุณลักษณะของผงไปโอแคลเซียมและแคลเซียมสารอนินทรีย์จากการเผากระดูกปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ (skipjack tuna) โดยวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิค XRD พบว่าผงไปโอแคลเซียมและแคลเซียมจากการเผากระดูกปลาที่อุณหภูมิสูง (1,100 องศาเซลเซียส) มีโครงสร้างผลึกที่เหมือนกัน ดังนั้นกระบวนการผลิตไปโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างทางผลึกของผงไปโอแคลเซียม



ภาพที่ 13 การเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตในขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม

1.11 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR

จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียมด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) (ภาพที่ 13) ผลการทดลองพบหมู่ amide I ในตัวอย่างกระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม ที่เลขคลื่น 1651 cm^{-1} มาจากการสั่นสะเทือนของการยืดตัวของหมู่คาร์บอนิลในเปปไทด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (Kristoffersen et al., 2019) โดยหมู่ amide I ที่พบมีค่าความสูงของพีคลดลงเมื่อกระดูกปลาผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม เนื่องจากนำกระดูกปลามาผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จะส่งผลให้เศษเนื้อที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ถูกกำจัดออกจากกระดูกปลา ทำให้พบหมู่ amide I ที่ลดลง นอกจากนี้ amide II ที่พบมีเลขคลื่น 1534 cm^{-1} จะเกี่ยวข้องกับการงอที่ตำแหน่ง N-H และการยืดตัวของ C-N สำหรับแถบ amide III พบที่เลขคลื่น 1235 cm^{-1} เกี่ยวข้องกับการยืดตัวของ C-N และ N-H ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างของคอลลาเจน ดังนั้นกระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม จะมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง นอกจากนี้ตำแหน่งที่เลขคลื่น 1046 , 601 และ 568 cm^{-1} ซึ่งเป็นการสั่นของหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{3-} , O-P) และที่ตำแหน่งเลขคลื่น 3347 และ 3420 cm^{-1} เกี่ยวข้องกับการยืดของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของโมเลกุลของน้ำ และไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Pal et al., 2017) อย่างไรก็ตามในตัวอย่างกระดูกปลาสดและกระดูกปลาที่ผ่านการฉีบน้ำแรงดันสูงจะพบการสั่นที่เลขคลื่น 2917 และ 2853 cm^{-1} ซึ่งเป็นการสั่นของหมู่ C-H ของโปรตีนและไขมัน และจะไม่พบหมู่ดังกล่าวในผงไบโอแคลเซียม แสดงให้เห็นว่าไบโอแคลเซียมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากไขมันและโปรตีนจากกล้ามเนื้อปลา เนื่องจากกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ มีผลกำจัดเศษเนื้อ และไขมันที่ยังหลงเหลืออยู่ในกระดูก



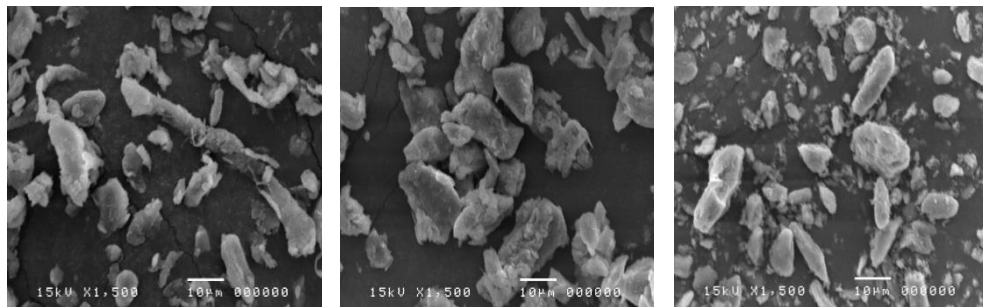
ภาพที่ 14 FTIR spectrum ของไปโอแคลเซียมจากกระจกพลาสติกผสมบีกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตในขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม

1.12 โครงสร้างสัณฐานวิทยา

การศึกษาโครงสร้างสัณฐานวิทยาของกระจกพลาสติกผสมบีกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตไปโอแคลเซียมขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม โดยใช้เทคนิคถ่ายภาพอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงดังภาพที่ 14 พบว่าโครงสร้างทางจุลภาคตัวอย่างกระจกสดเริ่มต้น (ภาพที่ 14 (0)) มีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนผลึก Hexagonal เมื่อผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม (ภาพที่ 14 (4)) ที่มีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็กกระจายตัวออกจากกัน ซึ่งโครงสร้างทางจุลภาคของกระจกพลาสติกผสมบีกสยาม (ภาพที่ 14 (0)) และกระจกที่ผ่านการฉีดน้ำด้วยเครื่องฉีดน้ำแรงดันสูง (ภาพที่ 14 (1)) ที่มีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มก้อน เนื่องจากกระจกปลายังมีโปรตีนไขมันรวมอยู่ด้วยจึงมีหลายโครงสร้างเกาะรวมกันเป็นกลุ่มก้อน แต่เมื่อนำกระจกปลามาผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนการฉีดน้ำแรงดันสูง (ภาพที่ 14 (2, 3)) จนได้เป็นไปโอแคลเซียมที่มีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็กกระจายตัวออกจากกัน ซึ่งผงไปโอแคลเซียมที่ได้นี้ได้ผ่านการกำจัดเศษเนื้อที่มีโปรตีนและไขมันเป็นองค์ประกอบออกไป ทำให้ได้เป็นไปโอแคลเซียมที่มีความบริสุทธิ์มากกว่ากระจกพลาสติกที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นต้น ซึ่งตัวอย่างผงกระจกพลาสติกที่มีลักษณะการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ อาจเนื่องมาจากโครงสร้างทางเคมีของไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนและหมู่ฟังก์ชัน ไฮดรอกซิลที่มีภายในโครงสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์ในสภาวะที่มีความชื้นในอากาศสูง (กันตวัฒน์, 2555) สอดคล้องกับผลการทดลอง FTIR (ภาพที่ 13) ที่ในตัวอย่างกระจกพลาสติกพบหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลของน้ำ และมีความสูงของพีคลดลงเมื่อผ่าน

กระบวนการผลิตต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม เนื่องจากกระบวนการผลิตแต่ละขั้นตอนจะมีการกำจัดน้ำจากกระบวนการอบแห้งกระดูกปลาจนได้เป็นผงไบโอแคลเซียมที่แห้งหรือมีความชื้นต่ำ

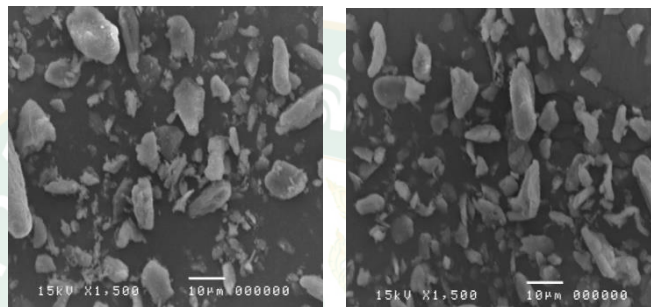
การกระจายตัวของแร่ธาตุ (EDX mapping) ของพื้นผิวกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามจากกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมในขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม แสดงในภาพที่ 15 พบการกระจายตัวของแร่ธาตุต่าง ๆ ได้แก่ แคลเซียม (Ca) และฟอสฟอรัส (P) นอกจากนี้ยังรวมถึงธาตุที่เป็นองค์ประกอบของสารประกอบอินทรีย์ เช่น คาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) และออกซิเจน (O) ซึ่งธาตุเหล่านี้สามารถพบเป็นองค์ประกอบได้ทั่วไปในกระดูกปลา โดยเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างกระดูก และโครงสร้างเส้นใยคอลลาเจนกับแคลเซียมฟอสเฟตที่อยู่ในรูปผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) (Benjakul et al., 2017) เมื่อนำกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามสด ซึ่งมีการกระจายตัวของธาตุ C N O Ca และ P อย่างหนาแน่น (ภาพที่ 15 (a)) มาผ่านกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมในขั้นตอนต่าง ๆ ได้แก่ การฉีดล้างด้วยเครื่องฉีดน้ำแรงดันสูง การแช่สารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จะพบว่าธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสมีการกระจายตัวของธาตุมากและหนาแน่นขึ้น (ภาพที่ 15 (b, c)) แต่คาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) และออกซิเจน (O) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของของสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ โปรตีน และไขมัน พบว่ามีการกระจายตัวน้อยลงมาก เนื่องจากกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมที่ใช้สารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และกระบวนการกำจัดไขมันด้วยตัวทำละลายเอทานอล สามารถกำจัดสารประกอบอินทรีย์ เช่น โปรตีน ไขมัน ที่มีธาตุ คาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) และออกซิเจน (O) เป็นองค์ประกอบออกจากกระดูกได้ ทำให้กระดูกมีความสะอาดเพิ่มขึ้น และมีสารประกอบอินทรีย์ลดลง ส่วนการแช่ตัวทำละลายเอทานอล และการฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไม่มีผลทำให้ปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัส และสารประกอบอินทรีย์ (ภาพที่ 15 (d, e)) เปลี่ยนแปลงไปมากนัก ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากภาพการกระจายตัวของธาตุแบบ mapping analysis โดยใช้ SEM-EDX แสดงให้เห็นว่ากระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามขั้นตอนต่าง ๆ สามารถกำจัดสารประกอบอินทรีย์ คือ โปรตีน และไขมันที่ไม่ต้องการออกไป และให้เหลือสารประกอบอินทรีย์แคลเซียม และฟอสฟอรัส รวมถึงสารประกอบอินทรีย์คอลลาเจน และเปปไทด์ในผงไบโอแคลเซียม



(0) กระจกพลาสติก

(1) ฉีดน้ำแรงดันสูง

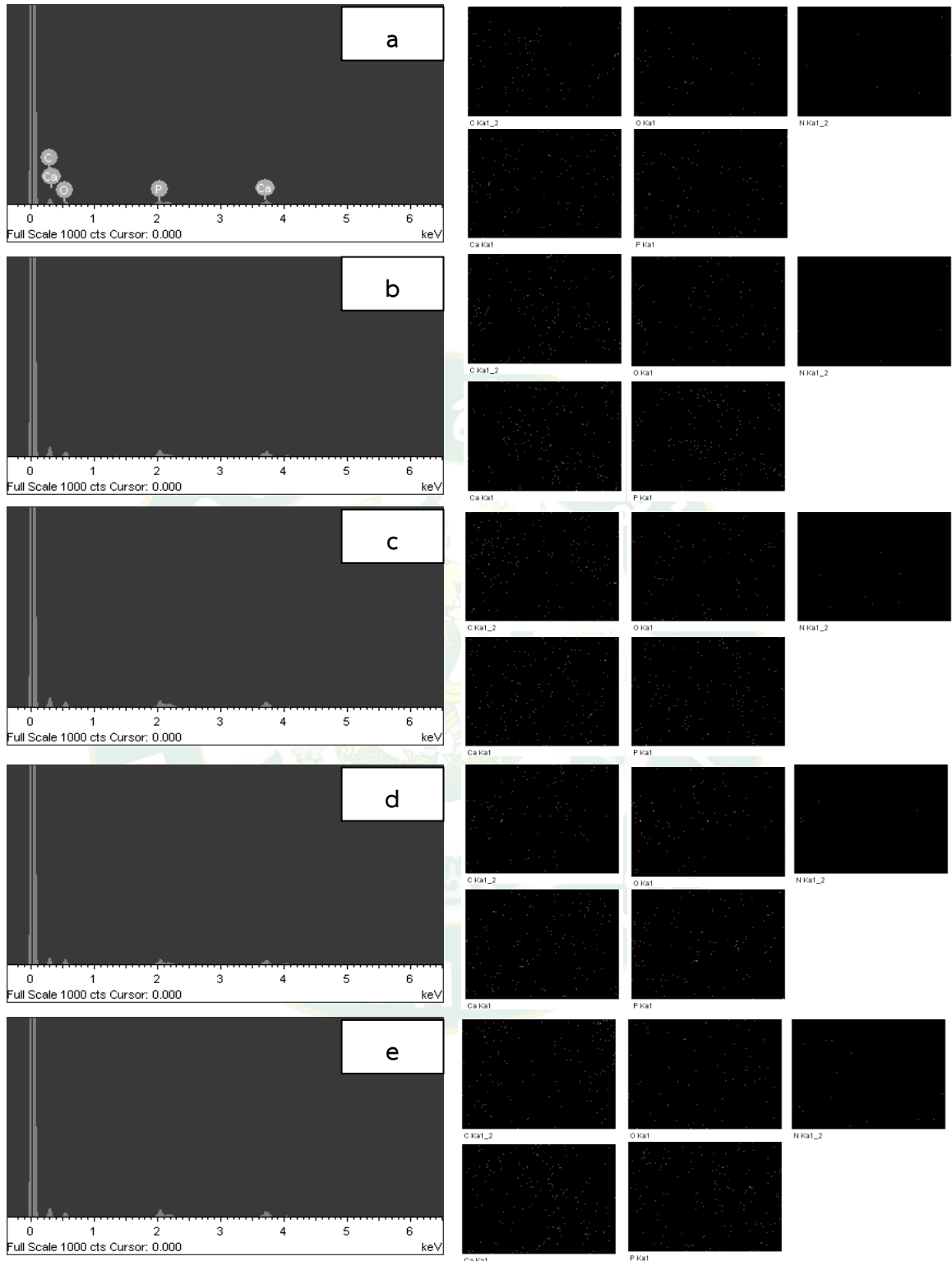
(2) แซ่สารละลายต่าง



(3) แซ่ตัวทำละลายเอทานอล

(4) ผงไบโอแคลเซียม

ภาพที่ 15 โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของกระจกพลาสติกผสมบีกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิต
ขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียมที่กำลังขยาย 1500 เท่า



ภาพที่ 16 การวิเคราะห์การกระจายตัวของธาตุแบบ mapping analysis โดยใช้ SEM-EDX ของ กระดุกพลาสติกผสมบีกสยามที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไปโอแคลเซียม
 หมายเหตุ : a = กระดุกพลาสติก, b = ฉีดย้ำแรงดันสูง, c = แซ่สารละลายต่าง, d = แซ่ตัวทำละลายเอทานอล, e = ผงไปโอแคลเซียม

ตอนที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า

2.1 องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบทางเคมีของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้าแสดงดังตารางที่ 11 พบว่า ไบโอแคลเซียมมีปริมาณความชื้น โปรตีน และไขมันสูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์ และแคลเซียมทางการค้า ($p \leq 0.05$) ส่วนแคลเซียมอนินทรีย์มีปริมาณความชื้นไม่แตกต่างจากแคลเซียมทางการค้า และมีปริมาณเถ้าสูงถึงร้อยละ 97.00 ± 1.48 ซึ่งมากกว่าไบโอแคลเซียม และแคลเซียมทางการค้าที่มีปริมาณเถ้าร้อยละ 68.15 ± 3.60 และ 90.90 ± 2.03 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมทางการค้ามีปริมาณเถ้าเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนปริมาณโปรตีน ไขมัน และความชื้นพบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนที่พบในไบโอแคลเซียมร้อยละ 2.86 ± 0.13 ซึ่งมากกว่าตัวอย่างแคลเซียมอนินทรีย์ และแคลเซียมทางการค้า ซึ่งเหตุผลที่ไบโอแคลเซียมมีปริมาณโปรตีนสูงเนื่องมาจากกระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจะใช้กระบวนการผลิตที่ไม่รุนแรงต่าง ๆ คือ กระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูง การแช่สารละลายต่าง การแช่ตัว ทำละลายเอทานอล และการฟอกสีก่อนบดให้เป็นผงไบโอแคลเซียม ทำให้ไบโอแคลเซียมที่ได้ยังคงมีสารอินทรีย์คอลลาเจน เปปไทด์ และกรดอะมิโนเหลืออยู่ในปริมาณที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (ภาพที่ 9) รูปแบบโปรตีน (ภาพที่ 10) และปริมาณกรดอะมิโนต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบ (ตารางที่ 9) ของไบโอแคลเซียมจากตอนที่ 1 ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในกระดูกสัตว์คือคอลลาเจน (Gistelinc et al., 2016) แต่ไม่พบว่ามีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในแคลเซียมอนินทรีย์ และแคลเซียมทางการค้า ซึ่งไฮดรอกซีโพรลีนเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนโพรลีน โดยพบว่าเป็นองค์ประกอบเฉพาะและเป็นเอกลักษณ์ของคอลลาเจนและเจลาติน (Stoilov et al., 2018) แต่แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาอุกผสมบีกสยามที่ผ่านกระบวนการเผาที่อุณหภูมิสูง 1,100 องศาเซลเซียส จะทำให้สารประกอบอินทรีย์ในกระดูกปลาสลายหายไปกับความร้อน จึงไม่พบว่ามีปริมาณโปรตีน และไขมัน คงเหลือแต่สารประกอบอนินทรีย์ (Benjakul et al., 2017) ขณะที่แคลเซียมทางการค้า เป็นแคลเซียมชนิดแคลเซียมคาร์บอเนต มีรายงานว่าแคลเซียมจากกระดูกปลาเป็นแคลเซียมที่อยู่ในรูปแบบไฮดรอกซีอะพาไทต์ ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Benjakul et al., 2017) และยังมีรายงานอีกว่าการเผากระดูกสัตว์ที่อุณหภูมิสูง (>1000 องศาเซลเซียส) ทำให้ได้สารประกอบอนินทรีย์ที่ค่าอัตราการซึมผ่านของน้ำต่ำ และมีความสามารถในการจับกับน้ำลดลง (เอกสิทธิ์ และคณะ, 2563)

ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีของไบโอแคสเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า

ตัวอย่าง	องค์ประกอบทางเคมี (% โดยน้ำหนักสด)			
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ไบโอแคสเซียม	1.42 ± 0.45 ^{a**}	2.86 ± 0.13 ^a	0.07 ± 0.03 ^a	68.15 ± 3.60 ^c
แคลเซียมอนินทรีย์	0.39 ± 0.28 ^b	0.07 ± 0.02 ^c	0.03 ± 0.01 ^b	97.00 ± 1.48 ^a
แคลเซียมทางการค้า	0.93 ± 0.37 ^b	1.68 ± 0.34 ^b	0.05 ± 0.02 ^{ab}	90.90 ± 2.03 ^b

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

2.2 คำสี

คำสีของไบโอแคสเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า แสดงดังตารางที่ 12 พบว่าตัวอย่างไบโอแคสเซียมและแคลเซียมทางการค้ามีค่าความสว่าง (L^*) และค่าความต่างของสี ΔE^* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วนค่า a^* แสดงถึงค่าความเป็นสีเขียว ($-a^*$) และสีแดง ($+a^*$) จากผลการทดลองแคลเซียมทั้ง 3 ตัวอย่างมีค่าค่อนข้างไปทางสีเขียว ($-a^*$) โดยแคลเซียมอนินทรีย์มีความเป็นสีเขียว ($-a^*$) มากที่สุด (-3.09 ± 0.07) ตามด้วยไบโอแคสเซียม (-1.43 ± 0.02) และแคลเซียมทางการค้า (-1.26 ± 0.02) อย่างไรก็ตามค่า b^* แสดงถึงค่าความเป็นสีน้ำเงิน ($-b^*$) และสีเหลือง ($+b^*$) จากผลการทดลองพบว่าไบโอแคสเซียมมีค่าความเป็นสีเหลือง ($+b^*$) สูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์และแคลเซียมทางการค้า เมื่อพิจารณาองศาแคลเซียมทั้ง 3 ชนิด ด้วยตาเปล่า พบว่าผงไบโอแคสเซียมมีสีขาวนวล ปนสีเหลืองอ่อน เนื่องจากผงไบโอแคสเซียมผ่านกระบวนการฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ไบโอแคสเซียมมีสีขาวสว่างมากขึ้น อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในไบโอแคสเซียม ตารางที่ 11 พบว่าไบโอแคสเซียมมีปริมาณไขมันร้อยละ 0.07 ± 0.03 ซึ่งปริมาณไขมันที่หลงเหลืออยู่ในไบโอแคสเซียมมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ทำให้ไบโอแคสเซียมเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีขาวเป็นสีเหลืองอ่อน ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Hamre และคณะ (2003) ที่ศึกษาการเก็บรักษาเนื้อปลาเฮอรั้งในระหว่างการแช่เยือกแข็ง พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อปลาเฮอรั้งที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (< -18 องศาเซลเซียส) พบว่าจะมีค่าความเป็นสีเหลือง และค่า TBARS ที่สูงขึ้น ซึ่งเกี่ยวข้องกับกาเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ไขมันที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบคาร์บอนิลและอัลดีไฮด์ ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (non-enzymatic reaction) จึงทำให้มีค่าความเป็นสีเหลือง ($+b^*$) สูงขึ้น ส่วนแคลเซียมอนินทรีย์

จากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยามที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 1,100 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ ได้แก่ โปรตีน และไขมัน ให้สลายหายไป ทำให้ผงแคลเซียมอนินทรีย์ที่ได้ไม่มีสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (non-enzymatic reaction) นอกจากนี้เม็ดสีบางชนิด โดยเฉพาะไมโอโกลบิน และฮีโมโกลบินยังถูกทำลายในระหว่างการเผา (Benjakul et al., 2017)

ตารางที่ 12 ค่าสีของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า

ตัวอย่าง	L*	a*	b*	ΔE^*
ไบโอแคลเซียม	49.18 ± 0.37 ^{a**}	-1.43 ± 0.02 ^b	5.93 ± 0.04 ^a	51.00 ± 0.35 ^b
แคลเซียมอนินทรีย์	44.07 ± 0.41 ^b	-3.09 ± 0.07 ^c	2.96 ± 0.13 ^b	55.76 ± 0.39 ^a
แคลเซียมทางการค้า	49.58 ± 0.08 ^a	-1.26 ± 0.02 ^a	1.68 ± 0.05 ^c	50.49 ± 0.08 ^b

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)



ผงไบโอแคลเซียม

ผงแคลเซียมอนินทรีย์

ผงแคลเซียมทางการค้า

ภาพที่ 17 ภาพถ่ายแสดงลักษณะของผงไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า

2.3 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้าแสดงดังตารางที่ 13 พบว่าปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนจะพบเฉพาะในตัวอย่างผงไบโอแคลเซียมซึ่งพบในปริมาณ 27.70 ± 2.84 mg/g sample แต่ไม่พบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในแคลเซียมอนินทรีย์ และแคลเซียมทางการค้า จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมด้วยกระบวนการที่ไม่รุนแรงโดยการนำกระดุกปลาอุกผสมบีกสยาม

มาผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เป็นผงไบโอแคลเซียม ได้แก่ การฉีดน้ำแรงดันสูง การแช่สารละลายต่าง การแช่ตัวทำละลายเอทานอล และการฟอกสีก่อนบดเป็นผงไบโอแคลเซียม จะทำให้กระดูกปลายังคงหลงเหลือสารประกอบอินทรีย์ คือ คอลลาเจนอยู่ในโครงสร้างในปริมาณที่สูง ซึ่งไฮดรอกซีโพรลีนเป็นอนุพันธ์กรดอะมิโนโพรลีนที่พบเฉพาะในคอลลาเจน (Stoilov et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดงโดยใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้เปปไทด์ที่มีความยาวสายที่สั้นและได้ร้อยละผลผลิตคอลลาเจนต่ำกว่าการไม่ใช้ความร้อน (ฉลองขวัญ และคณะ, 2551) อย่างไรก็ตามแคลเซียมอินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามที่ผ่านการเผาด้วยการใช้ความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 1,100 องศาเซลเซียส ทำให้แคลเซียมที่ได้ไม่หลงเหลือสารประกอบอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอลลาเจน จึงทำให้ไม่พบว่ามีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในตัวอย่างแคลเซียมอินทรีย์ ดังนั้นการใช้กระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมด้วยกระบวนการที่ไม่รุนแรงข้างต้น ไม่เพียงแต่จะทำให้ได้สารประกอบอินทรีย์แคลเซียมและฟอสฟอรัสเท่านั้น แต่ยังทำให้ได้สารประกอบอินทรีย์ คอลลาเจน และเปปไทด์ที่จับกับแคลเซียมไอออน (peptide binding Ca^{2+}) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ มีรายงานว่าคอลลาเจนและคอลลาเจนไฮโดรไลเซต มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Wang et al., 2013) อีกทั้งคอลลาเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Lassoued et al., 2015) ต้านมะเร็ง (Yamazaki et al., 2020) ต้านการอักเสบ (Offengenden et al., 2018) ยับยั้งเอนไซม์ angiotensin-converting enzyme (ACE) (Fu et al., 2016)

ตารางที่ 13 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของไบโอแคลเซียมของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยาม และแคลเซียมทางการค้า

ตัวอย่าง	ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (mg/g sample)
ไบโอแคลเซียม	27.70 ± 2.84 ^a
แคลเซียมอินทรีย์	0.00 ± 0.05 ^b
แคลเซียมทางการค้า	0.00 ± 0.00 ^b

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

2.4 ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ

ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ของไบโอแคลเซียม และแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม แสดงดังตารางที่ 14 พบว่าปริมาณของสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในไบโอแคลเซียมพบมากกว่าแคลเซียมอนินทรีย์ ซึ่งสารประกอบที่ระเหยได้ส่วนใหญ่ที่พบในไบโอแคลเซียมเป็นสารประกอบในกลุ่มของอัลดีไฮด์ (Aldehyde) โดยพบว่าสารกลุ่มนี้เป็นผลิตภัณฑ์จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน เช่น Heptanal, Octanal และ Nonanal โดยสารประกอบทั้ง 3 ชนิดนี้จะพบในไบโอแคลเซียมมากกว่าแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม ซึ่งเกิดจากการออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) (Iglesias and Medina, 2008) จากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในไบโอแคลเซียม (ตารางที่ 11) พบว่าไบโอแคลเซียมยังมีไขมันหลงเหลืออยู่ ซึ่งไขมันที่หลงเหลืออาจเป็นสารตั้งต้น (substrate) ของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไบโอแคลเซียม นอกจากนี้ยังพบว่าไบโอแคลเซียมมีสารประกอบที่ระเหยได้กลุ่มแอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ และคีโตนในปริมาณที่สูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม ซึ่งสารประกอบที่ระเหยได้ในกลุ่มแอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ และ คีโตน เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Girad and Durance, 2000) ดังนั้นแคลเซียมอนินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการเผาโดยใช้อุณหภูมิสูง (1,100 องศาเซลเซียส) จะส่งผลทำให้สารประกอบที่ระเหยได้บางชนิดสลายไปได้มากกว่าไบโอแคลเซียมที่ผลิตด้วยกระบวนการที่ไม่รุนแรง ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Benjakul และคณะ (2017) ที่ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ในไบโอแคลเซียม และแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ (skipjack tuna) พบว่าปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในแคลเซียมอนินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการเผาที่อุณหภูมิสูงกว่า 900 องศาเซลเซียส มีปริมาณลดลงเป็นอย่างมากเมื่อเทียบกับไบโอแคลเซียม

ตารางที่ 14 ปริมาณสารประกอบที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ของไบโอแคเซียม และแคลเซียมนินทรีย์ จากกระดุกปลาอุกผสมบึงสยาม

สารประกอบที่ระเหยได้	ไบโอแคเซียม	แคลเซียมนินทรีย์
Aldehydes		
Dimethyl ether	ND	ND
Pentanal	ND	ND
Hexanal	15.60	ND
Octanal	2.68	ND
Heptenal	2.12	ND
Nonanal	17.92	9.33
Benzaldehyde	37.75	ND
Ketones		
3-Octanone, 2-methyl-	ND	ND
Alcohols		
1-Penten-3-ol	ND	ND
1-Hexanol	4.78	6.94
1-Octen-3-ol	18.57	13.08
Benzyl alcohol	1.60	3.10
Acids		
Formic acid, octyl ester	29.61	30.38
Hexanoic acid, anhydride	ND	ND
Pentanoic acid	ND	ND
Acetic acid, phenylmethly ester	11.14	ND
Hexanoic acid	ND	ND
Heptanoic acid	ND	ND
Octanoic acid	ND	ND
Nonanoic acid	ND	ND
Other		
Phenol	ND	ND
2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	2.45	ND
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	3.76	2.50

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นพื้นที่ใต้กราฟ ($\times 10^6$)

ND = ไม่พบ

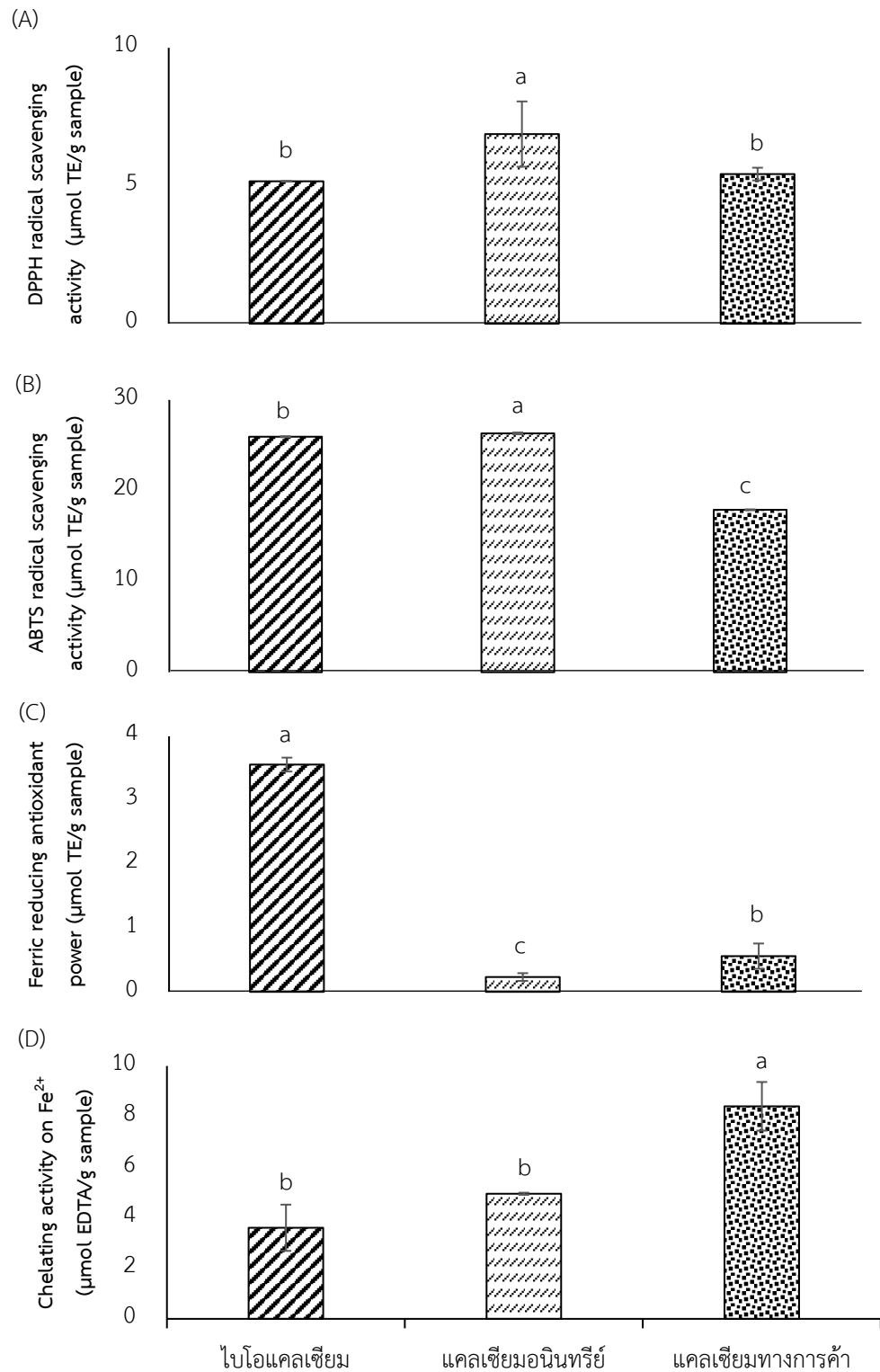
2.5 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH[•] (ภาพที่ 17 (A)) และ ABTS[•] (ภาพที่ 17 (B)) ของใบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบึงสยาม และแคลเซียมทางการค้า พบว่าแคลเซียมอนินทรีย์มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH[•] และ ABTS[•] สูงกว่าใบโอแคลเซียมและแคลเซียมทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH[•] และ ABTS[•] เป็นการศึกษากิจกรรมดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) กลไกการดักจับอนุมูลอิสระเกิดขึ้นโดยการให้ไฮโดรเจนและอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Valacchi et al., 2004) เพื่อให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น มีรายงานว่าในผงไข่มุกที่มีธาตุแคลเซียมเป็นองค์ประกอบมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงมาก โดยแคลเซียมจะทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ในกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Iranzo, 2011) อาจเป็นไปได้ว่าแคลเซียมอนินทรีย์มีความสามารถที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS[•] ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ซึ่ง DPPH[•] เป็นอนุมูลอิสระอยู่ในสารละลายจะมีสีม่วงเข้ม จะสูญเสียอิเล็กตรอนให้กับโมเลกุลอื่น โดยมีตัวรับอิเล็กตรอนคือสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] จะเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปออกซิไดซ์ (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (stable free radical) (Chen et al., 2020) และ ABTS[•] เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก ในสารละลายจะมีสีเขียวเข้มเกิดจากการออกซิเดชันของ ABTS ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสีเขียวของสารละลายจะจางลง (Ciou et al., 2020) หากมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้น ภายใต้อาการดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย (เจนจิรา, 2554) การทำลายหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระดังกล่าว จะช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นสามารถลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ รวมถึงโรคอื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ (Liu, 2016)

การวิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของใบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบึงสยามแม่โจ้ และแคลเซียมทางการค้า แสดงดังภาพที่ 17 (C) ซึ่ง FRAP เป็นการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของตัวอย่างโดยการรีดิวซ์เฟอร์ริก (Fe^{3+}) ให้เป็นเฟอร์รัส (Fe^{2+}) (ปวีณา, 2559) ตัวอย่างผงใบโอแคลเซียมมีค่า FRAP สูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์ และแคลเซียมทางการค้า ($p \leq 0.05$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าใบโอแคลเซียมมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ เช่น คอลลาเจน และเปปไทด์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ (Vázquez et al., 2008) มีรายงานว่าปลายสายของโปรตีนทุกชนิดประกอบไปด้วยหมู่อะมิโน (NH_2) และหมู่คาร์บอกซิลิก ($COOH$) ซึ่งมีความสามารถในการรับส่งอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระ (Chi et al., 2014) อีกทั้งเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนไอออนให้กับอนุมูลอิสระ

นอกจากนี้กรดอะมิโน เช่น Glycine (Gly), Alanine (Ala) และ Aspartic acid (Asp) จะช่วยเสริมการทำงานของเปปไทด์ร่วมกับไขมัน ส่งผลทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียร (Zamorano et al., 2020) ซึ่งชนิดของกรดอะมิโน เปปไทด์ ที่แตกต่างกันที่โซ่ข้าง (R- groups) เช่น Tyrosine (Tyr), Tyrosine (Trp) และ cysteine (Cys) ที่จะประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH), กลุ่มอินโดล (indole group, -NH) และหมู่ไทออล (thiol group, -SH) ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวมีโซ่ข้าง (R- groups) เป็นวงแหวน สามารถทำให้อนุมูลอิสระเสถียรผ่านเรโซแนนซ์ (resonance) หรือการทำให้อนุมูลอิสระอยู่ประจำที่ (delocalization) เป็นผลทำให้สลายปฏิกิริยา ลูกลูโซออกซิเดชันได้ (Tsopmo et al., 2009)

การวิเคราะห์ค่าความสามารถในการจับโลหะ (Fe^{2+}) ของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์ จากกระดูกปลาลูกผสมบึงสยาม และแคลเซียมทางการค้าแสดงดังภาพที่ 17 (D) พบว่าตัวอย่าง แคลเซียมทางการค้ามีค่าความสามารถในการจับโลหะเฟอร์รัส (Fe^{2+}) สูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์ และไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบึงสยามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากแคลเซียมทางการค้าเป็นแคลเซียมที่อยู่ในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต โดยเมื่อละลายจะเพิ่มความ เป็นต่างและจับกับโลหะเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ได้ดี ซึ่งโลหะไอออนโดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (Saiga et al., 2003)



ภาพที่ 18 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH^{*} (A) กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ABTS^{*} (B) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (C) และความสามารถในการจับกับโลหะ Fe^{2+} (D) ของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมสมัยบึงสยาม และแคลเซียมทางการค้า
หมายเหตุ : * ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันบนแท่งกราฟมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

2.6 การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหารที่ทดสอบในหลอดทดลอง (Calcium bioavailability of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion)

การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหารที่ทดสอบในหลอดทดลองของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยาม และแคลเซียมทางการค้า แสดงดังตารางที่ 15 พบว่าที่สภาวะจำลองการย่อยของกระเพาะอาหารในหลอดทดลอง พบว่าแคลเซียมอนินทรีย์มีปริมาณแคลเซียม 4081.00 ± 81.00 mg/L ซึ่งสูงกว่าไบโอแคลเซียมและแคลเซียมทางการค้าที่มีปริมาณแคลเซียมเท่ากับ 2439.00 ± 1.00 และ 3139.00 ± 49.00 mg/L ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่แคลเซียมอนินทรีย์มีปริมาณฟอสฟอรัสเท่ากับ 1736.00 ± 26.00 mg/L ซึ่งสูงกว่าไบโอแคลเซียมและแคลเซียมทางการค้าที่มีปริมาณฟอสฟอรัสเท่ากับ 1060.00 ± 1.00 และ 26.45 ± 0.66 mg/L ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) และที่สภาวะจำลองการย่อยของลำไส้ส่วนดูโอดินัมในหลอดทดลอง พบว่าไบโอแคลเซียมมีปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสไม่ต่างจากแคลเซียมอนินทรีย์ ($p > 0.05$) แต่กลับมีปริมาณแคลเซียมสูงกว่าแคลเซียมทางการค้า ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาถึงค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียม (Calcium Bioavailability) หรือค่าความสามารถของแคลเซียมที่ร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ได้ พบว่าไบโอแคลเซียมมีค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมเท่ากับ 18.94 ± 0.19 % ซึ่งสูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์จากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยาม (11.53 ± 0.12 %) และแคลเซียมทางการค้า (11.19 ± 0.11 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งจากผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wijayanti และคณะ (2020) ที่ได้ศึกษาผลของกระบวนการผลิตและการฟอกสีต่อคุณสมบัติของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลากระพงดำ พบว่าค่าการละลายของไบโอแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหารของไบโอแคลเซียมจากกระบวนการฟอกสีมีค่าสูงกว่าแคลเซียมจากกระบวนการนึ่งกระดูกปลาในหม้อแรงดัน ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ความร้อนและแรงดันสูงจึงทำให้โปรตีน ไขมัน และสารอินทรีย์อื่น ๆ เสียสภาพ คล้ายกับการนำไปเผาที่เป็นการกำจัดสารอินทรีย์ออกไป ซึ่งไบโอแคลเซียมมีค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมที่สูงเท่ากับ 18.94 ± 0.19 % เนื่องจากไบโอแคลเซียมเป็นแคลเซียมที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่ได้แก่ คอลลาเจน เปปไทด์ และคอนทรอยติน เป็นต้น มีรายงานว่าแคลเซียมที่จับกับสารอินทรีย์จะถูกดูดซึมได้ดีในลำไส้ (Jung et al., 2006) ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าโปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีประจุบวก และประจุลบในโมเลกุล จึงทำให้มีสมบัติเชิงหน้าที่ในการละลาย การเกิดโฟม การเกิดอิมัลชัน และการเกิดเจล มีรายงานว่า การใช้เคซีนหรือเคซีนฟอสโฟเปปไทด์ช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมในหนูทดลอง (Bennett et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในกระดูกปลาช่วยเพิ่มค่าการละลายของแคลเซียม และการดูดซึมทางชีวภาพในหนูทดลองเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ (Jung et al., 2006) อย่างไรก็ตามการรับประทานอาหารที่มีโปรตีนสูงในสตรีวัยผู้ใหญ่จะทำให้มีการดูดซึมแคลเซียมในลำไส้เพิ่มขึ้น (Kerstetter et al., 2005) Lorieau

และคณะ (2018) พบว่าแคลเซียมจากแหล่งนมที่แตกต่างกันที่มีไฮดรอกซีโพรลีนที่เป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนโพรลีนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมแคลเซียมดีขึ้นในระบบจำลองการย่อยอาหารในลำไส้ เนื่องจากกระบวนการย่อยและการดูดซึมแคลเซียมของลำไส้จะมีค่าพีเอชประมาณ 7 ส่วนใหญ่จะทำให้แคลเซียม และสารประกอบอินทรีย์เกิดการตกตะกอน (Lorieau et al., 2018) แต่ไบโอแคลเซียมมีสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ คอลลาเจน และเปปไทด์ เมื่อผ่านกระบวนการย่อยจากกระเพาะอาหารก็จะปลดปล่อยกรดอะมิโนออกมาทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลงส่งผลให้แคลเซียมและฟอสฟอรัสยังคงละลายได้ และอยู่ในรูปของไอออนอิสระ จึงทำให้ดูดซึมแคลเซียมได้เพิ่มมากขึ้น (Benjakul et al., 2017)

ตารางที่ 15 การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียม (Calcium bioavailability) ในระบบจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลองของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอินทรีย์จากกระดูกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า

Conditions	ไบโอแคลเซียม	แคลเซียมอินทรีย์	แคลเซียมทางการค้า
Stomach			
Ca mg/L	2439.00 ± 1.00 ^c	4081.00 ± 81.00 ^a	3139.00 ± 49.00 ^b
P mg/L	1060.00 ± 1.00 ^b	1736.00 ± 26.00 ^a	26.45.00 ± 0.66 ^c
Duodenal			
Ca mg/L	461.89 ± 0.19 ^a	470.43 ± 9.34 ^a	351.40 ± 5.49 ^b
P mg/L	200.74 ± 1.07 ^a	200.12 ± 27.18 ^a	2.96 ± 0.80 ^b
Ca Bioavailability (%)	18.94 ± 0.19 ^a	11.53 ± 0.12 ^b	11.19 ± 0.11 ^c

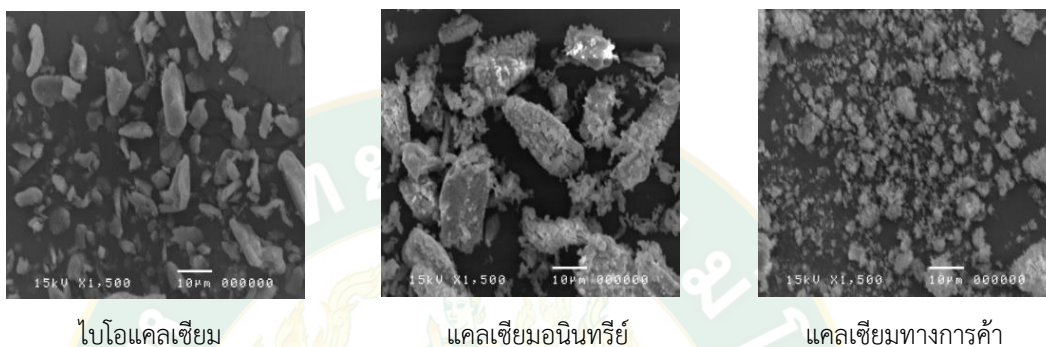
หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

2.7 โครงสร้างทางสัณฐานวิทยา

โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอินทรีย์จากกระดูกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า จากภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงดังภาพที่ 18 ซึ่งจะเห็นได้ว่าผงแคลเซียมทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยผงไบโอแคลเซียมมีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็กขนาดประมาณ 5 – 10 ไมโครเมตร และมีการกระจายตัวออกจากกันดีกว่าแคลเซียมอินทรีย์ ซึ่งมีขนาดอนุภาคประมาณ 10 – 20 ไมโครเมตร แต่เมื่อพิจารณาลักษณะของผงแคลเซียมทางการค้าจะพบว่า มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดเล็กกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และมีขนาด

อนุภาคประมาณ 0.5 – 2 ไมโครเมตร อย่างไรก็ตามไบโอแคลเซียมมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ทำให้สามารถรวมตัวกับความชื้นได้ดี จึงส่งผลทำให้ผงแคลเซียมที่ได้มีลักษณะกลุ่มก้อนที่จับตัวกันมากกว่า อีกทั้งแคลเซียมอินทรีย์ที่ผ่านการใช้ความร้อนจากการเผาที่อุณหภูมิสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกระดูกซึ่งสามารถช่วยให้อนุภาคของแคลเซียมมีความสม่ำเสมอมากขึ้น รวมทั้งมีความละเอียดและเป็นทรงกลมมากขึ้นอีกด้วย (Idowu et al., 2020)



ไบโอแคลเซียม

แคลเซียมอินทรีย์

แคลเซียมทางการค้า

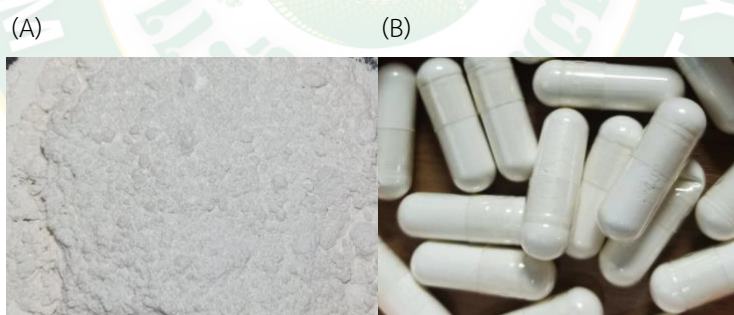
ภาพที่ 19 โครงสร้างทางจุลภาคของไบโอแคลเซียม แคลเซียมอินทรีย์สารจากกระดูกปลาอุกผสม บีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า

ตอนที่ 3 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามชนิดบรรจุแคปซูล

การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามบรรจุแคปซูล (ภาพที่ 19) เพื่อต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบทางการค้า ประกอบไปด้วย 4 สูตร ดังนี้ สูตรที่ 1 ไบโอแคลเซียม สูตรที่ 2 ไบโอแคลเซียมเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต สูตรที่ 3 ไบโอแคลเซียมเสริมแคลเซียมแอสคอร์เบต (Vitamin C) และสูตรที่ 4 ไบโอแคลเซียมเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตผสมกับวิตามินซี ซึ่งทุกสูตรจะถูกบรรจุลงแคปซูล ขนาดบรรจุ 500 มิลลิกรัม/แคปซูล

ตารางที่ 16 ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ

ส่วนผสมใน 1 แคปซูล (500 มิลลิกรัม)	สูตร			
	(1)	(2)	(3)	(4)
ไบโอแคลเซียม (Bio-Ca)	400	400	400	400
คอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Col)	0	100	0	50
แคลเซียมแอสคอร์เบต (Vit C)	0	0	100	50
มอลโทเดกซ์ทรีน (MD)	100	0	0	0



ภาพที่ 20 ภาพแสดงลักษณะของผงไบโอแคลเซียม (A) และไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล (B)

3.1 ค่าสี

ค่าสีของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามบรรจุแคปซูล 4 สูตร แสดงดังตารางที่ 17 พบว่า ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม มีลักษณะเป็นผงละเอียด สีขาวนวล เมื่อนำมาบรรจุลงแคปซูลขนาดบรรจุ 500 มิลลิกรัม กับส่วนผสมต่าง ๆ ได้แก่ คอลลาเจนไฮโดรไลเซต และแคลเซียมแอสคอร์เบต (Vit C) พบว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) และสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีค่าความสว่าง (L^*) เท่ากับ 49.53 ± 0.53 และ 49.11 ± 0.22

ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 1 (Bio-Ca) และสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) ซึ่งมีค่าความสว่าง (L*) เท่ากับ 48.64 ± 0.21 และ 48.73 ± 0.21 ตามลำดับ นอกจากนี้ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) และสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) มีค่าความเป็นสีเหลือง (+b*) เท่ากับ 5.25 ± 0.09 และ 5.17 ± 0.03 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 1 (Bio-Ca + MD) และสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีค่าความเป็นสีเหลือง (+b*) เท่ากับ 4.49 ± 0.02 และ 4.89 ± 0.02 ตามลำดับ อีกทั้งไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) และสูตรที่ 1 (Bio-Ca + MD) มีค่าความเป็นสีแดง (+a*) เท่ากับ -0.89 ± 0.22 และ -1.19 ± 0.02 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) และสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) ที่มีค่าความเป็นสีแดง (+a*) เท่ากับ -1.32 ± 0.01 และ -1.30 ± 0.02 ตามลำดับ ส่วนค่าความต่างสี (ΔE^*) ของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นสีขาวมาตรฐาน พบว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) มีค่าความต่างสี (ΔE^*) แตกต่างจากสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Col + Vit C) และสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) เนื่องจากไบโอแคลเซียมสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซต ซึ่งคอลลาเจนไฮโดรไลเซตมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน ทำให้ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 2 มีค่าสีเหลืองมากกว่าสูตรอื่น ๆ

ตารางที่ 17 ค่าสีของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ

ตัวอย่าง	L*	a*	b*	ΔE^*
(1) Bio-Ca	$48.64 \pm 0.21^{*b**}$	-1.19 ± 0.02^b	4.49 ± 0.02^c	2.25 ± 0.09^c
(2) Bio-Ca + Col	48.73 ± 0.21^b	-1.32 ± 0.01^c	5.25 ± 0.09^a	2.70 ± 0.07^a
(3) Bio-Ca + Vit C	49.11 ± 0.22^{ab}	-0.89 ± 0.02^a	4.89 ± 0.02^b	2.44 ± 0.05^b
(4) Bio-Ca + Col + Vit C	49.53 ± 0.53^a	-1.30 ± 0.02^c	5.17 ± 0.03^a	2.55 ± 0.02^b

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

3.2 ร้อยละปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้

ร้อยละปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามบรรจุแคปซูล 4 สูตร แสดงดังตารางที่ 18 พบว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลทุกสูตรมีค่าร้อยละปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 2.54 – 4.30 และค่าร้อยละปริมาณความชื้นที่พบในผลิตภัณฑ์

ไบโอแคลเซียมทุกสูตรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามค่าร้อยละปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลอยู่ในเกณฑ์อาหารแห้ง ซึ่งสามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน อีกทั้งแคปซูลเจลาตินที่ใช้เป็นวัสดุบรรจุผงไบโอแคลเซียมสามารถรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ โดยแคปซูลมีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของอากาศและไอน้ำได้ดี เมื่ออ้างอิงตามมาตรฐานตำรับยาของสหรัฐอเมริกา (USP 34) ค่าความชื้นต้องไม่เกิน 5% (Saiyasombat et al., 2014) ซึ่งผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลมีค่าความชื้นเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นต่ำทำให้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน ซึ่งความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ในอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมได้

ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w) ของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ ทั้ง 4 สูตร แสดงดังตารางที่ 17 พบว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลทั้ง 4 สูตร มีค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ในช่วง 0.226 – 0.241 ซึ่งค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ที่พบในแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ปริมาณความชื้นที่พบในตัวอย่างไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลมีค่าต่ำกว่า 5% และค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ต่ำกว่า 0.6 ดังนั้นผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามนี้จัดอยู่ในกลุ่มอาหารแห้ง ซึ่งมีอายุการเก็บรักษาที่นาน เนื่องจากค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w) แสดงถึงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลไม่มีน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ ไบโอแคลเซียมจึงไม่เสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามเพื่อรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารจึงต้องเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมและเก็บในที่แห้งและเย็นเพื่อป้องกันการดูดน้ำกลับ

ตารางที่ 18 ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w) ของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ

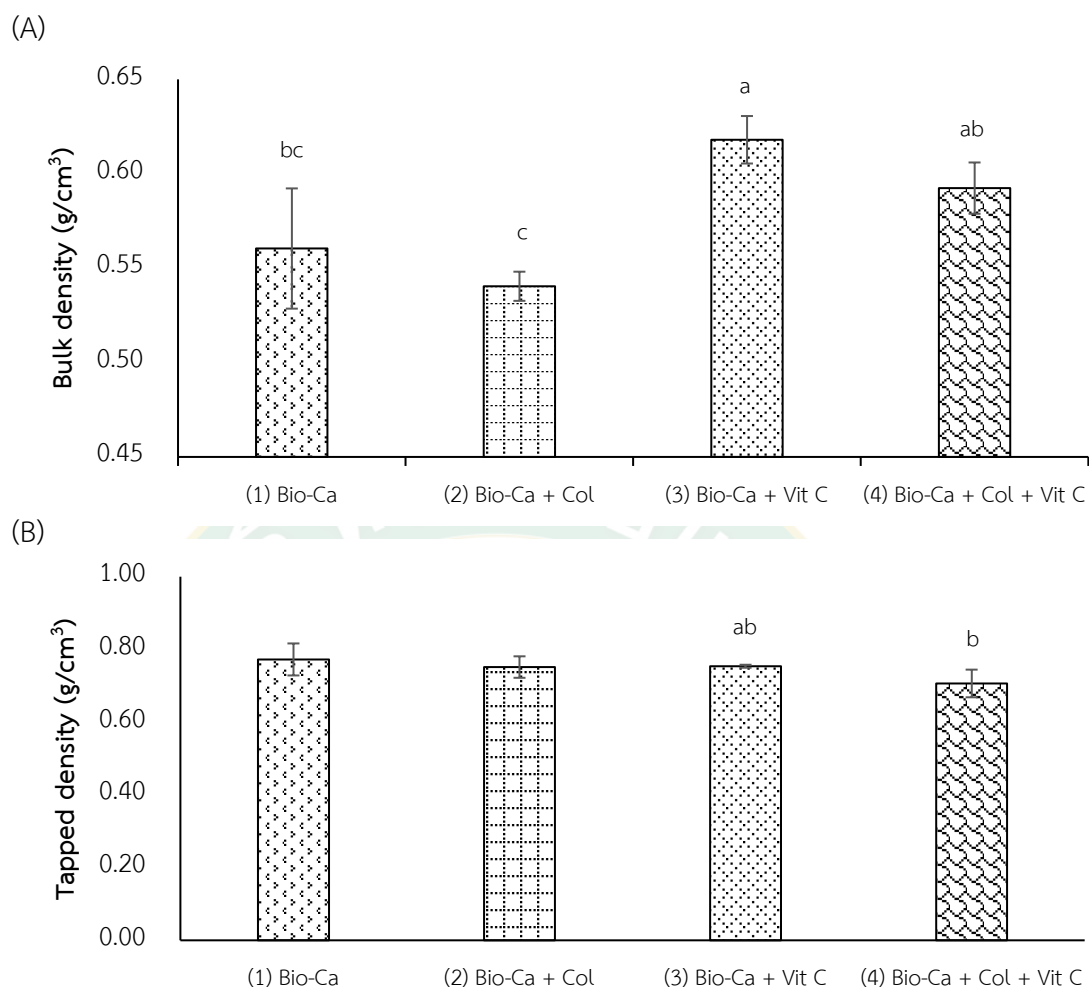
ตัวอย่าง	ความชื้น (%)	ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w)
(1) Bio-Ca	4.30 ± 0.29 ^a	0.241 ± 0.02 ^a
(2) Bio-Ca + Col	2.54 ± 1.28 ^a	0.241 ± 0.02 ^a
(3) Bio-Ca + Vit C	2.99 ± 1.21 ^a	0.226 ± 0.02 ^a
(4) Bio-Ca + Col + Vit C	3.75 ± 0.60 ^a	0.234 ± 0.01 ^a

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq 0.05$)

3.3 ค่าความหนาแน่นรวม (Bulk density) และความหนาแน่นจำเพาะ (Tapped density)

ค่าความหนาแน่นรวม (Bulk density) ของผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามสูตรต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 20 (A) พบว่าผงไบโอแคลเซียมสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) และสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) มีค่าความหนาแน่นรวมเท่ากับ 0.67 ± 0.01 และ 0.59 ± 0.01 g/cm^{-3} ตามลำดับ สูงกว่าสูตรที่ 1 (Bio-Ca) มีความหนาแน่นรวมเท่ากับ 0.56 ± 0.03 g/cm^{-3} และสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) มีความหนาแน่นรวมเท่ากับ 0.54 ± 0.01 g/cm^{-3} ซึ่งมีค่าความหนาแน่นต่ำที่สุด ($p \leq 0.05$) ความหนาแน่นรวม (bulk density) เป็นสมบัติทางกายภาพของวัสดุ ซึ่งแสดงถึงความหนาแน่นของวัสดุมวลต่อปริมาตร หรือมวลของวัสดุหารด้วยปริมาตรของวัสดุซึ่งรวมช่องว่างระหว่างวัสดุด้วย ดังนั้นผงไบโอแคลเซียมสูตรที่ 1 (Bio-Ca) และสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) มีน้ำหนักที่เท่ากันแต่ปริมาตรของอากาศแทรกอยู่ในปริมาณที่สูงทำให้มีปริมาตรมากกว่า เมื่อนำมาบรรจุแคปซูลจึงต้องระวังการฟุ้งกระจาย เนื่องจากมีมวลเบาแต่ปริมาตรสูง ส่วนค่าความหนาแน่นจำเพาะ (Tapped density) ของผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามสูตรต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 20 (B) เป็นค่าความหนาแน่นของตัวอย่างเมื่อถูกกดอัดลงไป พบว่าผงไบโอแคลเซียมทั้ง 4 สูตรมีค่าความหนาแน่นจำเพาะแตกต่างกันเล็กน้อย อย่างไรก็ตามผงไบโอแคลเซียมสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) มีค่าความหนาแน่นจำเพาะน้อยกว่าผงไบโอแคลเซียมสูตรอื่น ๆ ($p \leq 0.05$)



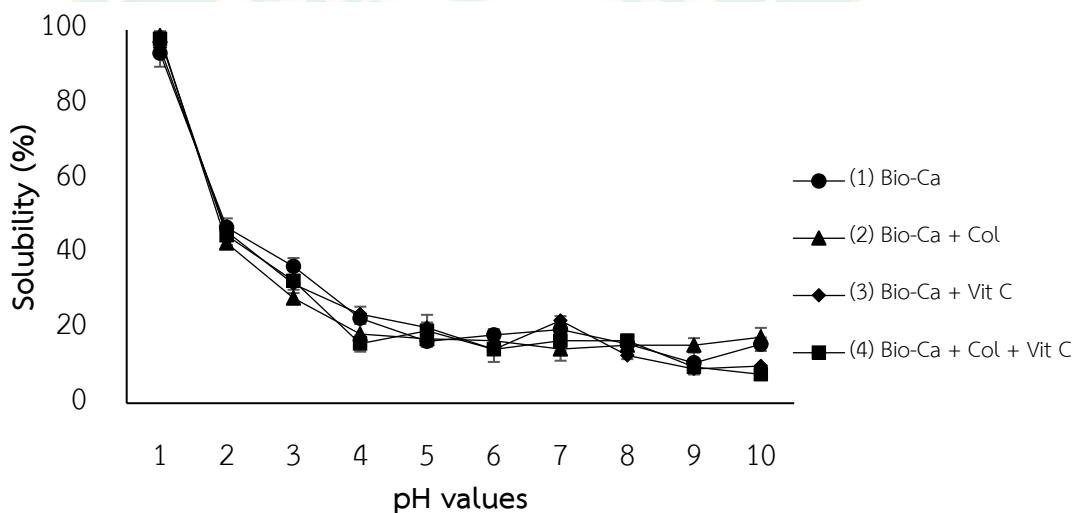
ภาพที่ 21 ค่าความหนาแน่นรวม (A) และค่าความหนาแน่นจำเพาะ (B) ของผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมสูตรต่าง ๆ

หมายเหตุ : * ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันบนแท่งกราฟมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

3.4 ร้อยละของการละลายของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียม

ค่าร้อยละของการละลายของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลในช่วงค่าพีเอช 1 – 10 แสดงดังภาพที่ 21 จากผลการทดลองพบว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลทั้ง 4 สูตร มีค่าร้อยละของการละลายสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกรด (pH 1 - 4) โดยไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลมีค่าการละลายสูงสุดที่พีเอช 1 อยู่ในช่วงร้อยละ 93.73 – 98.44 อย่างไรก็ตามค่าร้อยละการละลายของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลทั้ง 4 สูตร จะค่อย ๆ ลดลงจนถึงที่ค่าพีเอชเท่ากับ 4 จะมีค่าร้อยละการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 15.99 – 23.83 และร้อยละการละลายของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลทุก

สูตรจะมีค่าลดลงอย่างช้า ๆ และคงที่เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าร้อยละของการละลายของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลทุกสูตรในช่วงค่าพีเอช 5 – 10 จะมีค่าเท่ากับร้อยละ 7.73 – 20.25 ซึ่งมีค่าร้อยละของการละลายลดลงเป็นอย่างมาก เนื่องจากสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ใช้ปรับค่าพีเอชในช่วง 1 - 6 จะปล่อยไฮโดรเจนไอออน (H^+) ออกมาละลายแร่ธาตุในไบโอแคลเซียมแตกตัวเป็นไอออนละลายอยู่ในสารละลาย และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ใช้ปรับค่าพีเอชในช่วง 7 - 10 จะปล่อยไฮดรอกไซด์ (OH^-) จับกับแร่ธาตุในไบโอแคลเซียมที่แตกตัวเป็นไอออนจึงไม่ละลาย นอกจากนี้ในไบโอแคลเซียมมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบที่จะส่งผลต่อค่าร้อยละของการละลายของไบโอแคลเซียม เนื่องจากค่าพีเอชที่ห่างจากจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric points, PI) จะทำให้ประจุสุทธิของโปรตีนที่มีค่าเป็นบวกหรือลบเพิ่มขึ้นทำให้โปรตีนมีการละลายที่สูง (Vojdani, 1996) Li และคณะ (2013) ศึกษาการสกัดและคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเบสจากกระดูกและหนังปลาอินทรี พบว่าเมื่อค่าพีเอชน้อยกว่าหรือมากกว่าค่าจุดไอโซอิเล็กทริก ส่งผลให้โปรตีนมีผลรวมของประจุสุทธิเป็นบวกและเป็นลบ ตามลำดับ จึงเกิดแรงผลักกันระหว่างประจุของโปรตีนทำให้เกิดการละลายและคงตัวในสารละลายนั้นได้ ในทางกลับกันถ้าพีเอชเข้าใกล้หรือเท่ากับค่า PI ส่งผลให้โปรตีนมีผลรวมของประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงไม่เกิดแรงผลักกันระหว่างประจุของโปรตีนทำให้เกิดการรวมกลุ่มกันด้วยแรง hydrophobic – hydrophobic reaction และตกตะกอน (Vojdani, 1996) มีรายงานว่า PI ของคอลลาเจนอยู่ในช่วงค่าพีเอช 6 – 9 (Foegeding et al., 1996)



ภาพที่ 22 ร้อยละของการละลายที่ค่าพีเอชต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล 4 สูตร
 หมายเหตุ : * ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันบนแท่งกราฟมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

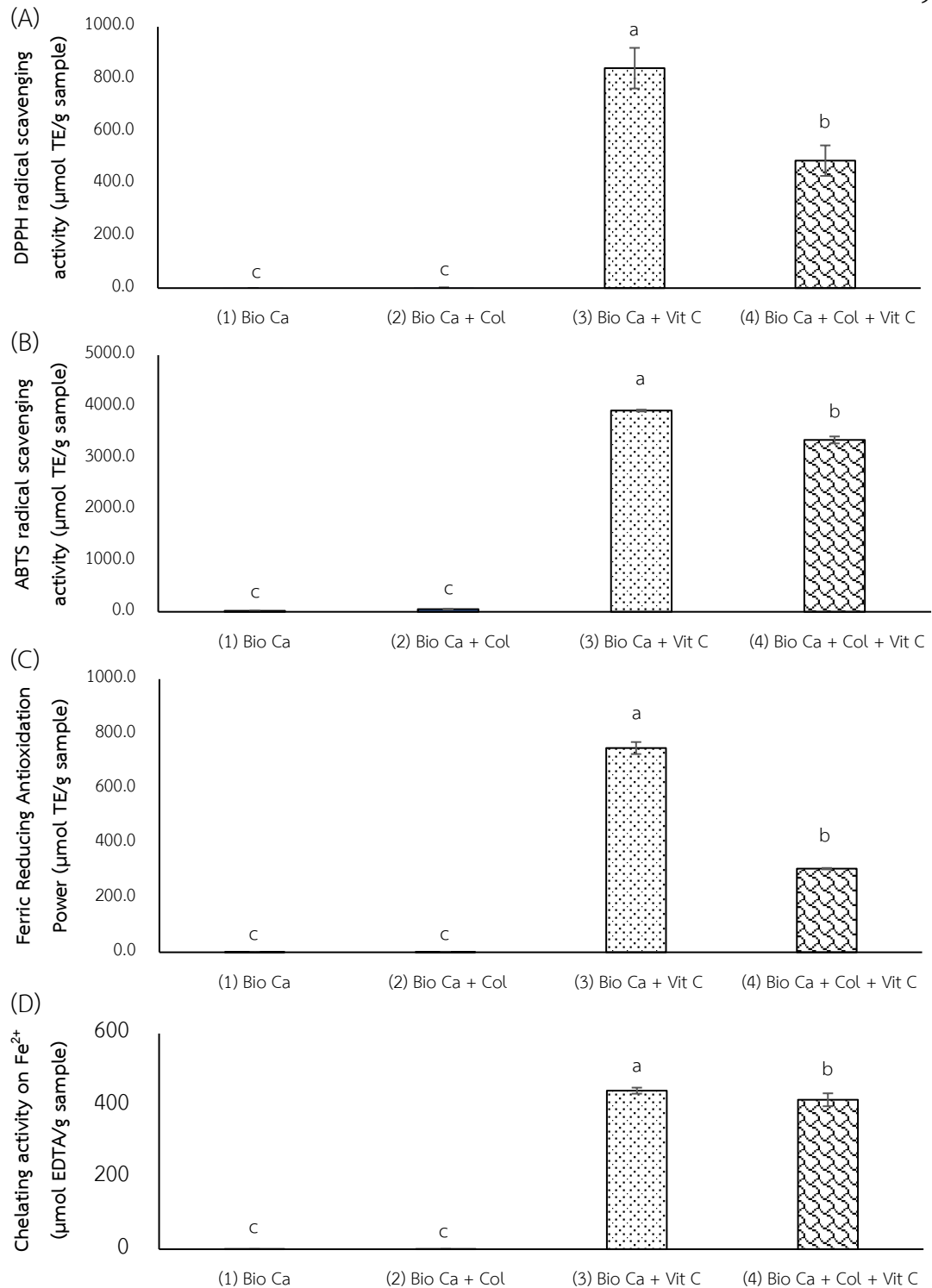
3.5 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ แสดงในภาพที่ 22 จากผลการทดลองพบว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH[•] (ภาพที่ 22 (A)) และ ABTS[•] (ภาพที่ 22 (B)) รวมถึงค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (ภาพที่ 22 (C)) และความสามารถในการจับกับโลหะ Fe²⁺ (ภาพที่ 22 (D)) สูงกว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตามด้วยไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) และสูตรที่ 1 (Bio-Ca) อย่างไรก็ตามไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) มีค่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันทั้ง 4 วิธี น้อยที่สุด ซึ่งไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 มีค่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันทั้ง 4 วิธี น้อยมากและไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) อนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS[•] เป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ นอกจากนี้ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS[•] สูงกว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) และสูตรอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากสูตรที่ 4 มีการผสมวิตามินซีเช่นกันแต่ผสมในสัดส่วนที่น้อยกว่า จึงมีค่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันที่ต่ำกว่า มีรายงานว่าคอลลาเจนมีหมู่อะมิโน (NH₂) และหมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) ที่ปลายสายของโมเลกุลสามารถทำหน้าที่ให้โปรตรอนและอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรและยุติปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ (Baehaki et al., 2015) อีกทั้งกรดอะมิโน Histidine (His), Phenylalanine (Phe), Tyrosine (Tyr), Tryptophan (Trp) รวมถึงกรดอะมิโนที่มีวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) และกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino) มีส่วนเกี่ยวข้องในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซต (Sarmadi and Ismail, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าเปปไทด์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS[•] โดยการถ่ายโอนอะตอมของไฮโดรเจนให้แก่ ABTS^{•+} ทำให้อนุมูลอิสระมีความเป็นกลางและเสถียรขึ้น (Park and Jo, 2019) อีกทั้งวิตามินซีที่เป็นส่วนผสมในสูตรของไบโอแคลเซียมยังมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงอีกด้วย ซึ่งมีรายงานว่าวิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติในเซลล์ (ศรมน, 2559) สามารถให้อิเล็กตรอน 1 หรือ 2 อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ โดยมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างคือ เมื่อแอสคอร์เบตถูกออกซิไดส์จะเปลี่ยนไปเป็น ascorbyl radical ซึ่งเป็น mono-oxidized form ที่เสถียรและมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาลดลง และทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากการใช้ออกซิเจน โดยให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลเปอร์ออกซิล และอนุมูลไฮดรอกซิลที่จะมาทำอันตรายต่อผนังเซลล์ (Stadtman, 1991)

จากการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) (ภาพที่ 22 (C)) ผลการทดลองพบว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีค่า FRAP สูงกว่าสูตรอื่นอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งการวิเคราะห์ FRAP เป็นการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของตัวอย่างโดยการรีดิวซ์เฟอร์ริก (Fe^{3+}) ให้เป็นเฟอร์รัส (Fe^{2+}) (ปวีณา, 2559) ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนที่เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากหมู่ไพโรโรลและหมู่ไฮดรอกซิลในคอลลาเจนเปปไทด์ ซึ่งจะถ่ายโอนอิเล็กตรอนโดยปฏิกิริยารีดอกซ์ และความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมก็เป็นอีกกลไกหนึ่งที่ทำให้ค่าความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเพิ่มขึ้น (Chen et al., 2020) นอกจากนี้วิตามินซีเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase) โดยจะให้อิเล็กตรอนไปรีดิวซ์ออกซิเจน หรือทำให้ Cu^{2+} และ Fe^{2+} อยู่ในรูปรีดิวซ์ตลอด การทำลายหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระดังกล่าว จะช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น สามารถลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ รวมถึงโรคอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ความสามารถในการจับกับโลหะเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 22 (D) พบว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 3 (Bio Ca + Vit C) มีค่าความสามารถในการจับโลหะเฟอร์รัส (Fe^{2+}) สูงกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเกิดจากอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จับกับโลหะไอออน เช่น Cu^{2+} และ Fe^{2+} กลไกการจับกับโลหะไอออนของสารต้านออกซิเดชันนี้จะยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ (Zhou et al., 2008) มีรายงานว่าความสามารถในการจับกับโลหะของเปปไทด์มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่มีบทบาทสำคัญในการจับกับโลหะ โดยค่าความสามารถในการจับกับโลหะจะเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดลง (Megias et al., 2007) ไบโอแคลเซียมจากกระดุกปลาลูกผสมบิกสยามบรรจุแคปซูลเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต และแคลเซียมแอสคอร์เบต มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเป็นผลมาจากคอลลาเจนไฮโดรไลเซต และแคลเซียมแอสคอร์เบต ดังนั้นสารทั้ง 2 ชนิดนี้ เหมาะแก่การนำมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมเพื่อการค้า



ภาพที่ 23 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH^{*} (A), กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ABTS^{*} (B), ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (C), ความสามารถในการจับกับโลหะ Fe^{2+} (D) ของไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล 4 สูตร

หมายเหตุ : * ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันบนแท่งกราฟมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

3.6 การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหาร (Calcium bioavailability of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion)

การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหารของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมปีกสยามบรรจุแคปซูลทั้ง 4 สูตร แสดงดังตารางที่ 19 พบว่าในสภาวะการจำลองการย่อยของกะเพาะอาหารในหลอดทดลองไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีปริมาณแคลเซียมเท่ากับ 2524 ± 42 mg/L ซึ่งสูงกว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) สูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) และสูตรที่ 1 (Bio-Ca) มีปริมาณแคลเซียมเท่ากับ 2200 ± 8 , 2192 ± 23 และ 2109 ± 26 mg/L ตามลำดับ นอกจากนี้ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลทั้งสูตรที่ 2 (Bio-Ca + Col) และสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีปริมาณฟอสฟอรัสเท่ากับ 950.6 ± 8.1 และ 947.1 ± 2.8 mg/L ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 4 (Bio-Ca + Col + Vit C) และสูตรที่ 1 (Bio-Ca) ที่มีฟอสฟอรัสเท่ากับ 921.4 ± 7.3 และ 921.8 ± 5 mg/L ตามลำดับ เนื่องจากระบบจำลองการย่อยอาหารของกระเพาะในหลอดทดลองมีค่าความเป็นกรดสูง (pH 1-2) ทำให้สารประกอบต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบแคลเซียมจะละลายและแตกตัวเป็นแคลเซียมไอออนได้ดี อย่างไรก็ตามในสภาวะจำลองการย่อยและการปลดปล่อยแคลเซียมของลำไส้ในหลอดทดลอง พบว่าปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลทั้ง 4 สูตร มีปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ลดลงอย่างชัดเจน ซึ่งพบปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมอยู่ในช่วง 334 – 462 mg/L และฟอสฟอรัสอยู่ในช่วง 145 – 174 mg/L เนื่องจากการเปลี่ยนค่าพีเอชจากค่าพีเอชที่เป็นกรดสูงมาเป็นค่าพีเอชที่เป็นกลาง (pH 7) ในระบบจำลองการย่อยและการปลดปล่อยแคลเซียมของลำไส้ในหลอดทดลอง ทำให้สารประกอบอนินทรีย์ส่วนใหญ่จะเกิดการตกตะกอนที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.5 จึงไม่สามารถดูดซึมได้หรือดูดซึมได้น้อยลง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียม (Calcium bioavailability) ในระบบจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง พบว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 1 (Bio-Ca) และสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) มีค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมสูงกว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 1 (Bio-Ca) มีค่าการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมเทียบเท่ากับไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูลสูตรที่ 3 (Bio-Ca + Vit C) ที่มีการเติมแคลเซียมแอสคอร์เบต มีรายงานว่า การเสริมแคลเซียมเพียงอย่างเดียวสามารถเพิ่มความหนาแน่นของกระดูกได้จริง แต่ไม่ได้แสดงถึงความสมบูรณ์หรือความแข็งแรงของกระดูกได้อย่างแท้จริง เพราะไม่สามารถลดหรือป้องกันกระดูกหักในสภาวะกระดูกพรุนได้ (Kurabayashi, 2012) ดังนั้น การรับประทานแคลเซียมเสริมอาหารจึงควรรับประทานอาหารที่มีสารอาหารเพียงพอไปด้วย เช่น โปรตีน ที่สามารถให้กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการสร้างมวลกระดูก และส่งเสริมระดับสารคล้ายอินซูลิน (Insulin-like growth

factor I [IGF-I]) ในกระแสเลือดซึ่งมีส่วนสำคัญในการก่อตัวของกระดูก วิตามินดีจากการรับรังสียูวีบี (UVB) จากแสงแดดที่มีความสำคัญมากกว่าการได้รับจากอาหาร (วัชรินทร์ และมโนไท, 2563) ดังนั้นผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามบรรจุแคปซูลเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต และแคลเซียมแอสคอร์เบต นอกจากจะมีแคลเซียมและฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบหลักแล้วยังมีสารอินทรีย์ ได้แก่ โพรตีน เปปไทด์ คอลลาเจน และวิตามินซี ที่มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมแคลเซียมในร่างกายให้ดียิ่งขึ้น และยังมีการรายงานอีกว่าวิตามินซีสามารถป้องกันหรือแก้ไขภาวะกระดูกพรุนได้ (มาศ, 2562) ซึ่งวิตามินซีมีบทบาทสำคัญในการสร้างเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 3 จำเป็นต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast) อีกทั้งวิตามินซีมีความเป็นกรด ทำให้แคลเซียมละลายในกรดได้ดีขึ้นจึงเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีขึ้น

ตารางที่ 19 การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหารของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมชนิดบรรจุแคปซูลทั้ง 4 สูตร

Condition	(1) Bio-Ca	(2) Bio-Ca + Col	(3) Bio-Ca + Vit C	(4) Bio-Ca + Col + Vit C
Stomach				
Ca mg/L	2109 ± 26 ^c	2192 ± 23 ^b	2524 ± 42 ^a	2200 ± 8 ^b
P mg/L	921.8 ± 5 ^b	950.6 ± 8.1 ^a	947.1 ± 2.8 ^a	921.4 ± 7.3 ^b
Duodenal				
Ca mg/L	399.4 ± 4.92 ^b	334.67 ± 3.51 ^d	462.37 ± 7.69 ^a	376.52 ± 1.37 ^c
P mg/L	174.57 ± 0.95 ^a	145.13 ± 1.24 ^c	173.50 ± 0.51 ^a	157.69 ± 1.25 ^b
Ca Bioavailability	18.94 ± 0.19 ^a	15.27 ± 0.15 ^d	18.32 ± 0.18 ^b	17.11 ± 0.17 ^c

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ตอนที่ 4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยาม

4.1 ลักษณะทางกายภาพและค่าสี

ลักษณะพื้นผิวและภาพตัดขวางของผลิตภัณฑ์ขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับร้อยละ 0 10 20 และ 30 ของน้ำหนักแป้ง แสดงดังภาพที่ 23 (A) และ (B) พบว่าลักษณะภายนอกของขนมบราวนี่กรอบที่เสริมผงไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามที่ระดับต่าง ๆ มีสีน้ำตาลเข้ม และมีผิวที่มันวาว เมื่อพิจารณาค่าความหนาของชั้นขนมบราวนี่กรอบ พบว่าขนมบราวนี่กรอบสูตรควบคุม (ไม่เติมผงไบโอแคลเซียม) มีค่าความหนาของชั้นขนมบราวนี่มากกว่าชั้นขนมบราวนี่กรอบที่เติมผงไบโอแคลเซียม นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าลักษณะโครงสร้างของขนมบราวนี่กรอบที่เสริมผงไบโอแคลเซียมในระดับที่สูงขึ้นถึงร้อยละ 30 จะพบว่ามีรูพรุนเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากแต่มีขนาดของรูพรุนที่เล็กลง และขนมบราวนี่กรอบที่เติมผงไบโอแคลเซียมมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่เปราะและแตกง่ายกว่าบราวนี่กรอบสูตรควบคุม นอกจากนี้ขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมในระดับที่ต่ำ (10 % Bio-Ca) จะมีการขยายตัวของชั้นขนมบราวนี่น้อยในระหว่างการอบ เนื่องจากผงไบโอแคลเซียมในโครงสร้างของขนมบราวนี่กรอบจะขัดขวางการสร้างโครงข่ายเจลที่เหนียวและแน่น ทำให้มีความสามารถในการกักเก็บแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์น้อยลง ทำให้บราวนี่กรอบเกิดการพองตัวไม่เต็มที่ (Benjakul and Karnjanapratum, 2018)



ภาพที่ 24 ภาพลักษณะพื้นผิว (A) และภาพตัดขวาง (B) ของผลิตภัณฑ์ขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามที่ระดับต่าง ๆ

ค่าสีของตัวอย่างขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามที่ระดับต่าง ๆ พบว่าขนมบราวนี่กรอบชุดควบคุมมีค่าความสว่าง (L^*) น้อยที่สุด ($p \leq 0.05$) เนื่องจากขนมบราวนี่กรอบมีส่วนผสมของผงโกโก้เป็นหลัก ซึ่งผงโกโก้มีสีน้ำตาลเข้มทำให้ขนมบราวนี่กรอบที่เสริมไบโอแคลเซียมในปริมาณที่มากขึ้นมีค่าความสว่าง (L^*) เพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของปริมาณผงไบโอแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากผงไบโอแคลเซียมมีสีขาวนวลเมื่อผสมลงในขนมบราวนี่กรอบจะทำให้ผงโกโก้มีสีน้ำตาลเข้มลดลงในขนมบราวนี่กรอบ ขนมบราวนี่กรอบทุกสูตรมีค่าสีแดง (a^*) และสีเหลือง (b^*) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 20 ค่าสีของขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามที่ระดับต่าง ๆ

ค่าสี	ขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับต่าง ๆ (% น้ำหนักแป้ง)			
	0 % (ชุดควบคุม)	10 % Bio-Ca	20 % Bio-Ca	30 % Bio-Ca
L^*	9.81 ± 0.20^c	9.98 ± 0.14^{bc}	10.31 ± 0.05^a	10.19 ± 0.06^{ab}
a^*	3.74 ± 0.06^a	3.67 ± 0.13^a	3.67 ± 0.10^a	3.62 ± 0.04^a
b^*	3.19 ± 0.02^a	3.11 ± 0.06^a	3.12 ± 0.08^a	3.09 ± 0.04^a

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.2 ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้

ค่าปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w) ของขนมบราวนี่กรอบเสริมผงไบโอแคลเซียมที่ระดับร้อยละ 0 10 20 และ 30 ของน้ำหนักแป้ง แสดงดังตารางที่ 21 ผลการทดลองพบว่าขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับต่าง ๆ มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 1.12 – 3.89 โดยค่าปริมาณค่าขึ้นในขนมบราวนี่กรอบชุดควบคุม และขนมบราวนี่กรอบเสริมผงไบโอแคลเซียมทั้ง 4 สูตรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรมของน้ำอิสระของขนมบราวนี่กรอบชุดควบคุม และขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับต่าง ๆ ทั้ง 4 สูตร อยู่ในช่วง 0.239 – 0.341 ซึ่งขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมร้อยละ 20 และ 30 จะมีค่ากิจกรรมของน้ำอิสระเท่ากับ 0.331 ± 0.003 และ 0.391 ± 0.003 ตามลำดับ สูงกว่าขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมร้อยละ 10 และชุดควบคุม (ไม่เติมผงไบโอแคลเซียม) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของน้ำอิสระเท่ากับ 0.292 ± 0.008 และ 0.239 ± 0.024 ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) ซึ่งขนม

บรวนี่กรอบที่เสริมผงไบโอแคลเซียมในระดับที่สูงขึ้นจะมีปริมาณน้ำในแป้งขนมบรวนี่ลดลงอย่างมากในระหว่างการอบจนได้เป็นขนมบรวนี่กรอบสำเร็จรูป (Benjakul and Karnjanapratum, 2018) อย่างไรก็ตามขนมบรวนี่กรอบทั้ง 4 สูตร มีความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ที่ต่ำ จัดอยู่ในเกณฑ์อาหารแห้ง สามารถเก็บรักษาได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่เกิดการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ นอกจากนี้ขนมบรวนี่กรอบที่เสริมผงไบโอแคลเซียมจากการทดลองมีน้ำตาลเป็นส่วนผสมโดยน้ำตาลเป็นสารกลุ่มฮิวเมกแทนท์ (Humectant) ที่สามารถเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำได้ดี เกิดโมเลกุลพอลิเด็คซ์โตรส จับกับโมเลกุลของน้ำและดูดความชื้นได้ดี ทำให้เกิดโครงสร้างร่างแหจึงทำให้อาหารที่มีน้ำตาลเป็นส่วนผสมมีค่ากิจกรรมของน้ำอิสระต่ำ (Alizadeh et al., 2014)

ตารางที่ 21 ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ของขนมบรวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามที่ระดับต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ความชื้น (ร้อยละ)	ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w)
0 % (ชุดควบคุม)	1.12 ± 0.51 ^{a**}	0.239 ± 0.024 ^c
10 % Bio Ca	1.45 ± 0.18 ^a	0.292 ± 0.008 ^b
20 % Bio Ca	3.89 ± 2.22 ^a	0.331 ± 0.003 ^a
30 % Bio Ca	3.62 ± 2.77 ^a	0.341 ± 0.003 ^a

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.3 คุณลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัส

คุณลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสของขนมบรวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบีกสยามที่ระดับร้อยละ 0 10 20 และ 30 ของน้ำหนักแป้ง แสดงดังตารางที่ 22 พบว่าขนมบรวนี่กรอบสูตรควบคุม (ไม่เติมผงไบโอแคลเซียม) มีค่าความแตกเปราะ (Fracturability) เท่ากับ 952.35 ± 272.82 g ซึ่งสูงกว่าขนมบรวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมทุกระดับ (ร้อยละ 10 20 และ 30) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ขนมบรวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับร้อยละ 10 20 และ 30 จะมีค่าความแตกเปราะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากผลการทดลองเป็นไปได้ว่าผงไบโอแคลเซียมที่เสริมในขนมบรวนี่กรอบนั้นจะไปขัดขวางการเชื่อมต่อนพันธะของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่เป็นองค์ประกอบของแป้งที่เป็นส่วนผสมในขนมบรวนี่

กรอบ และไปขัดขวางการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนไกลอะดิน และกลูเตนินในแป้งสาลี เมื่อโครงสร้างเชื่อมต่อกันน้อยลงจึงทำให้ค่าความแตกเปราะน้อยลงด้วยเช่นกัน (Benjakul and Karnjanapratum, 2018) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าระยะที่ทำให้วัสดุแตก (Deformation) พบว่าขนมบราวนี่กรอบสูตรควบคุม และขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมร้อยละ 10 มีค่าระยะที่ทำให้วัสดุแตกน้อยกว่าขนมบราวนี่กรอบที่เสริมไบโอแคลเซียมร้อยละ 20 และ 30 ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับค่าความแตกเปราะที่เมื่อใช้แรงกดที่มากจะทำให้มีระยะการกดน้อยลง เนื่องจากขนมบราวนี่กรอบสูตรควบคุมมีปริมาณแป้งสาลีในสูตรส่วนผสมสูงกว่าขนมบราวนี่กรอบเสริมผงไบโอแคลเซียม ซึ่งในแป้งสาลีจะมีโปรตีนกลูเตนที่สามารถถูกออกซิไดซ์ด้วยน้ำจากการนวดทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ที่มีโครงสร้างที่แข็งแรงจึงทำให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัว (da Rosa Machado and Thys, 2019) จากผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Benjakul และ Karnjanapratum (2018) ที่ได้ทำการศึกษากการเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบ (skipjack tuna) ในผลิตภัณฑ์แครกเกอร์โฮลวีต พบว่าแครกเกอร์โฮลวีตเสริมผงไบโอแคลเซียมในระดับที่สูงขึ้นจะทำให้ค่าความแตกเปราะลดลง และสามารถเสริมผงไบโอแคลเซียมลงในแครกเกอร์โฮลวีตได้สูงถึงร้อยละ 30 ซึ่งไม่มีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแครกเกอร์ นอกจากนี้ Idowu และคณะ (2019) ศึกษาการเสริมไบโอแคลเซียมและโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงกระดูกปลาแซลมอนในผลิตภัณฑ์แครกเกอร์โฮลวีต พบว่าเมื่อแครกเกอร์โฮลวีตเสริมไบโอแคลเซียมเพียงอย่างเดียวมีค่าความสามารถในการแตกหักสูงมากกว่าแครกเกอร์โฮลวีตเสริมไบโอแคลเซียมร่วมกับโปรตีนไฮโดรไลเซต ซึ่งแครกเกอร์โฮลวีตเสริมไบโอแคลเซียมร่วมกับโปรตีนไฮโดรไลเซตในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของแครกเกอร์

ตารางที่ 22 ลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสของขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาลูกผสมบิกสยามที่ระดับต่าง ๆ

ตัวอย่าง	0 % (ชุดควบคุม)	10 % Bio-Ca	20 % Bio-Ca	30 % Bio-Ca
Fracturability (g)	952.3 ± 272.82 ^a	626.4 ± 242.23 ^b	650.8 ± 194.01 ^b	507.7 ± 68.43 ^b
Deformation at (mm)	0.19 ± 0.08 ^b	0.20 ± 0.03 ^b	0.59 ± 0.30 ^a	0.62 ± 0.25 ^a

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับร้อยละ 0 10 20 และ 30 ของน้ำหนักแป้ง แสดงผลดังตารางที่ 23 พบว่าขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมที่ระดับร้อยละ 10 มีคะแนนการยอมรับคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสในทุกด้าน ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส รสชาติ และความชอบโดยรวม สูงกว่าขนมบราวนี่กรอบชุดทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัสของบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจะสอดคล้องกับค่าความแตกเปราะ (facturability) และค่าระยะที่ทำให้วัตถุแตก (deformation) ที่มีค่าต่ำ แสดงให้เห็นว่าผู้ทดสอบชอบขนมบราวนี่กรอบที่มีค่าความแตกเปราะสูงมากกว่าขนมบราวนี่กรอบที่มีค่าความเปราะแตกต่ำกว่า ซึ่งขนมบราวนี่กรอบเป็นผลิตภัณฑ์ขนมอบ ประเภทคุกกี้แข็ง หรือแครกเกอร์ ที่จะต้องมีลักษณะแข็งเปราะ ซึ่งปริมาณความชื้นในขนมบราวนี่กรอบจะมีผลต่อความรู้สึกในช่องปากขณะรับประทาน และค่ากิจกรรมของน้ำอิสระในขนมบราวนี่กรอบยังเป็นตัวบ่งชี้อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ (VYTRÁSOVÁ, 2006) มีรายงานการเสริมแคลเซียมในผงโกโก้ซึ่งสามารถลดปริมาณสารออกซาเลตในโกโก้ได้ ซึ่งออกซาเลตที่เป็นสารยับยั้งการดูดซึมแคลเซียม ป้องกันการตกตะกอนของแคลเซียมที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิดนิ่วในไตได้ โดยแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จะเข้าจับกับออกซาเลตที่ละลายน้ำได้ (Huynh et al., 2020) ดังนั้นขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคลเซียมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรับประทานผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ที่เสริมแคลเซียม

ตารางที่ 23 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของขนมบราวนี่กรอบเสริมแคลเซียมจากกระดูกปลาอุกผสมบีกสยามที่ระดับต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	เนื้อสัมผัส	รสชาติ	ความชอบโดยรวม
0 % (ชุดควบคุม)	7.62 ± 1.21 ^{***}	7.96 ± 1.23 ^a	7.64 ± 1.27 ^a	7.44 ± 1.58 ^{ab}	7.54 ± 1.40 ^b	7.62 ± 1.29 ^b
10 % Bio-Ca	7.64 ± 1.10 ^a	7.9 ± 1.05 ^a	7.68 ± 1.27 ^a	7.82 ± 1.38 ^a	8.12 ± 1.26 ^a	8.16 ± 1.00 ^a
20 % Bio-Ca	7.46 ± 1.33 ^a	7.96 ± 1.11 ^a	7.6 ± 1.25 ^a	7.02 ± 1.65 ^b	7.36 ± 1.52 ^b	7.7 ± 0.97 ^b
30 % Bio-Ca	7.28 ± 1.39 ^a	7.84 ± 1.13 ^a	7.48 ± 1.13 ^a	6.94 ± 1.57 ^b	7.3 ± 1.23 ^b	7.26 ± 1.34 ^b

หมายเหตุ : * แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=50$)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

1. กระดุกปลาอุกผสมบีกสยามเมื่อนำมาผ่านกระบวนการผลิต ได้แก่ กระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูง แช่สารละลายต่าง แช่ตัวทำละลายเอทานอล ฟอกสี และบดให้เป็นผงไปโอแคลเซียม จะทำให้ได้ไปโอแคลเซียมที่คุณภาพที่ดีขึ้น มีสีขาวบริสุทธิ์ขึ้น ปราศจากกลิ่นคาว และเป็นผงละเอียด ดังนั้นการผลิตไปโอแคลเซียมจากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยาม ไม่เพียงแต่เป็นการลดของเสียจากอุตสาหกรรม แต่ยังเป็น การเพิ่มมูลค่าให้กับกระดุกปลาอุกผสมบีกสยามได้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมไปโอแคลเซียมมูลค่าสูงจากธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการผลิตที่ไม่รุนแรง และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคในอนาคตต่อไปได้

2. คุณลักษณะของไปโอแคลเซียม แคลเซียมอนินทรีย์สารจากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยาม และแคลเซียมทางการค้า มีความแตกต่างกันทั้งทางด้านองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน การดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหาร ซึ่งไปโอแคลเซียมเป็นแคลเซียมอินทรีย์ที่มีคอลลาเจนเปปไทด์ อนุพันธ์ของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน ต่างจากแคลเซียมอนินทรีย์และแคลเซียมทางการค้าซึ่งไม่พบ และไปโอแคลเซียมมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมสูงกว่าแคลเซียมอนินทรีย์และแคลเซียมทางการค้า

3. การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ต้นแบบไปโอแคลเซียมจากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยามชนิดแคปซูล ด้วยการเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต และแคลเซียมแอสคอร์เบตในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้จะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของไปโอแคลเซียมแล้วยังเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และการดูดซึมทางชีวภาพของแคลเซียมอีกด้วย

4. การประยุกต์ใช้ผงไปโอแคลเซียมเสริมในผลิตภัณฑ์ขนมบราวนี่กรอบ พบว่าการเสริมไปโอแคลเซียมในผลิตภัณฑ์ขนมบราวนี่กรอบส่งผลคุณภาพทางกายภาพ และทางด้านเนื้อสัมผัส คือขนมบราวนี่กรอบมีพื้นผิวที่แวววาวขึ้น มีความแข็งเปราะมากขึ้น และการเสริมไปโอแคลเซียมที่ระดับร้อยละ 10 ของน้ำหนักแป้ง ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการออกฤทธิ์ของไปโอแคลเซียมจากกระดุกปลาอุกผสมบีกสยามในทางเภสัชวิทยา เช่น ทดสอบการเป็นพิษ การออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์กระดุก สัตว์ทดลอง หรือผู้ป่วย ต่อไป

ในอนาคตเพื่อเป็นรายละเอียดข้อมูลที่เป็นประโยชน์เชิงสุขภาพของผู้บริโภคในการบริโภคไบโอแคสเซียมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

2. ระบุปริมาณการรับประทานไบโอแคสเซียมที่เหมาะสมสำหรับผู้บริโภค และระบุกลุ่มผู้บริโภคให้ตรงกับผลิตภัณฑ์ เช่น ไบโอแคสเซียมบรรจุแคปซูล เหมาะสำหรับผู้สูงอายุ กลุ่มสตรีวัยหมดประจำเดือน และกลุ่มบุคคลทั่วไป ส่วนขนมบราวนี่กรอบเสริมไบโอแคสเซียมควรออกแบบสูตรเหมาะสำหรับ กลุ่มเด็ก กลุ่มวัยรุ่น กลุ่มวัยทำงาน และกลุ่มบุคคลทั่วไป

3. การวางแผนทางด้านการตลาดของผลิตภัณฑ์ไบโอแคสเซียมจากกระดุกปลาถูกผสมบีกสยามในอนาคต



บรรณานุกรม

- กระทรวงสาธารณสุข. 2549. **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 355 เรื่อง อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท**. กรุงเทพฯ: กระทรวงสาธารณสุข.
- กันตวัฒน์ หมายสุเรน. 2555. **การเตรียมและการทดสอบของฟิล์มนาโนคอมโพสิตชีวภาพจากไคโตซานและไฮดรอกซีอะพาไทต์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และจารุวรรณ แสงกระจ่าง. 2554. **รายงานผลการวิจัย: การเจริญเติบโตและพันธุ์กรรมปลาหนังลูกผสมสายพันธุ์ใหม่เพื่อเพิ่มมูลค่าและสนับสนุนการส่งออก**. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้: เชียงใหม่ 42 น.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, ดวงพร อมรเลิศพิศาล, สุดาพร ตงศิริ, ชนกันต์จิตมนัส, วิวัฒน์ หวังเจริญ และ ธนันท์ ศุภกิจจานนท์. 2556. **คู่มือการเพาะเลี้ยงปลาบึกและปลาหนังลูกผสมบึกสยามแม่โจ้ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิสาหกิจชุมชน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, ดวงพร อมรเลิศพิศาล, สุดาพร ตงศิริ, ชนกันต์จิตมนัส, วิวัฒน์ หวังเจริญ และ ธนันท์ ศุภกิจจานนท์. 2555. **คู่มือการเพาะเลี้ยงปลาบึก ปลาสวาย และปลาลูกผสม (บึกสยาม) เพื่อเพิ่มมูลค่าและการตลาด**. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- กรมประมง. 2561. **มูลค่าส่งออกปลาน้ำจืดไทย**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www4.fisheries.go.th/local/index.php/main/view_activities/163/30529#. (24 ธันวาคม 2561).
- ขวัญชนก พสุวัต, สารเนตร ไวกกุล และโพชมงคล โชติญาณวงษ์. (2017). **การวิจัยแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนสำหรับการรักษาโรคเข่าเสื่อม ปีที่ 1**. สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข.
- จันทิมา เพียรผล. 2561. **การส่งออกปลาสวายเวียดนาม**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://www.fisheries.go.th/strategy/UserFiles/files/59.pdf>. (20 มกราคม 2564).
- เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม. 2554. **อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา**. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์, 1(1), 59-70.
- ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์, วรรณวิบูลย์ กาญจนบุญชู และวรรณิ จิรภาคย์กุล. 2551. **การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*)**. **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46**: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ, 46, 33-40.
- ชวลิต วิทยานนท์. (2544). **ปลาน้ำจืดไทย**. กรุงเทพมหานคร: นานมีบุ๊ค.

- ฐิตาภรณ์ รัตริน. 2554. การผลิตโยเกิร์ตนมแพะผงโดยการทำแห้งแบบพ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ณัฐธิดา มุกดา. 2552. ความต้องการฟอสฟอรัสและแคลเซียมในอาหารของปลานิลแดงแปลงเพศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ปริญญญา อันขวัญเมือง, สุภัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2560. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตุ๊กตุ๊กปริมาณมาก. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.
- ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ และนลินรัตน์ จิระเดชประไพ. 2558. การสกัดคอลลาเจนที่ละลายในกรดจากหนังปลานิล. กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 31 น.
- ปวีณา พันทอง. 2559. การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล และสิริรัตน์ จงฤทธิพร. 2555. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าจากเศษเหลือการแปรรูปปลาโมง. กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 33 น.
- พล ตัณฑเสถียร. 2560. **Brownie Bittle (บราวนี่กรอบ)**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.pholfoodmafia.com/recipe/brownie-brittle-บราวนี่กรอบ/>. (9 มกราคม 2564).
- มาศ ไม้ประเสริฐ. 2562. ความเสี่ยงจากการบริโภคสารเสริมอาหารแคลเซียม. **วารสารสุทธิปริทัศน์**, 32(พิเศษ), 248-261.
- มูฮิมบ๊ะ มะกาแล, นุซรีย์ อาร์พีญ และสุรีย์พร กังสนันท์. 2562. การยอมรับและพฤติกรรมของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์บราวนี่กรอบจากถั่วเขียวเพาะงอก. น. 720 - 728 ใน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. **โครงการประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้ ครั้งที่ 4**. สงขลา: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.
- แม่หญิงแพรวา. 2563. เปิดตำรา "บราวนี่" ขนมหวานขวัญใจมหาชน อ่านจบรู้เรื่อง!. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.wongnai.com/food-tips/content-of-brownie>. (20 มกราคม 2564)
- โรงพยาบาลแมคคอร์มิค. 2561. การตรวจวัดความหนาแน่นของกระดูกเพื่อวินิจฉัยภาวะกระดูกพรุน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.mccormickhospital.com/web/>

- articles/blogs/การตรวจวัดความหนาแน่นของกระดูกเพื่อวินิจฉัยภาวะกระดูกพรุน. (19 มกราคม 2564)
- วรินญา ปัญญาแก้ว. 2558. **การศึกษาผลของการรับประทานคอลลาเจนเสริมต่อความยืดหยุ่นและความชุ่มชื้นของผิว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต.
- วัชรินทร์ วงษาหล้า และมโนไท วงษาหล้า. 2563. การเสริมสร้างความแข็งแรงของกระดูก: แนวปฏิบัติเพื่อป้องกันและลดความเสี่ยงการเกิดโรคกระดูกพรุน. **วารสารศูนย์อนามัยที่ 9: วารสารส่งเสริมสุขภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อม**, 14(35), 410-424.
- ศรมน สุทิน. 2559. วิตามินกับอนูมูลอิสระ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ**, 2(1), 80-92.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2559. **ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลา**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.thailandtechshow.com/view_techno.php?id=407. (24 ธันวาคม 2561).
- อัจฉราวรรณ อินตะโมง. 2559. **การศึกษาคุณภาพเนื้อ คุณภาพซาก ต้นทุนและการยอมรับผลิตภัณฑ์ปลาสามชนิด (ปลาสวาย ปลานิล ปลาอุกผสมบิกสยาม (บิก x สวาย))**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- เอกสิทธิ์ ชาตินทุ, มณี อัครานนท์, พรชัย วงศ์วาสนา และยิ่งยง เมฆลอย. 2563. การพัฒนาเนื้อดินปั้นเซรามิกจากเขากวางแข็ง. **วารสารวิจัยรามคำแหง(วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)**, 23(1), 56-65.
- Abdel-Moemin, A. R. 2015. Healthy cookies from cooked fish bones. **Food Bioscience**, 12, 114-121.
- Adiba, B. D., Salem, B., Nabil, S. & Abdelhakim, M. 2011. Preliminary characterization of food tablets from date (*Phoenix dactylifera L.*) and spirulina (*Spirulina sp.*) powders. **Powder Technology**, 208(3), 725-730.
- Aeimlapa, R., Charoenphandhu, N., Suntornsaratooon, P., Wongdee, K., Tiyasatkulkovit, W., Kengkoom, K. & Krishnamra, N. 2018. Insulin does not rescue cortical and trabecular bone loss in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **The Journal of Physiological Sciences**, 68(5), 531-540.
- Akiyama, Y., Ito, M., Toriumi, T., Hiratsuka, T., Arai, Y., Tanaka, S., Futenma, T., Akiyama, Y., Yamaguchi, K., Azuma, A., Hata, K.I., Natsumi, N., & Honda, M. 2021. Bone formation potential of collagen type I-based recombinant peptide particles in rat calvaria defects. **Regenerative Therapy**, 16, 12-22.

- Alizadeh, M., Azizi-Lalabadi, M. & Kheirouri, S. 2014. Impact of using stevia on physicochemical, sensory, rheology and glycemic index of soft ice cream. **Food and Nutrition Sciences**, 5(4), 390-396.
- Anansukhaban, K. 2018. Incidence of hypocalcemia after total thyroidectomy in ratchaburi hospital. **Region 4-5 Medical Journal**, 34(3), 192-201.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis: AOAC Gaithersburg, MD.
- Baehaki, A., Nopianti, R., & Anggraeni, S. 2015. Antioxidant activity of skin and bone collagen hydrolyzed from striped catfish (*Pangasius pangasius*) with papain enzyme. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 7(11), 131-135.
- Batista, I. 1999. Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. **European Food Research and Technology**, 210(2), 84-89.
- Bäumler, E. R., Carrin, M. E. & Carelli, A. A. 2016. Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. **Journal of Food Engineering**, 178, 190-197.
- Benjakul, S. & Karnjanapratum, S. 2018. Characteristics and nutritional value of whole wheat cracker fortified with tuna bone bio-calcium powder. **Food Chemistry**, 259, 181-187.
- Benjakul, S., Mad-Ali, S., Senphan, T. & Sookchoo, P. 2018. Characteristics of biocalcium from pre-cooked skipjack tuna bone as affected by different treatments. **Waste and Biomass Valorization**, 9(8), 1369-1377.
- Benjakul, S., Mad-Ali, S., Senphan, T. & Sookchoo, P. 2017. Biocalcium powder from precooked skipjack tuna bone: Production and its characteristics. **Journal of Food Biochemistry**, 41(6), 1-8.
- Bennett, T., Desmond, A., Harrington, M., McDonagh, D., FitzGerald, R., Flynn, A., & Cashman, K. D. 2000. The effect of high intakes of casein and casein phosphopeptide on calcium absorption in the rat. **British Journal of Nutrition**, 83(6), 673-680.
- Benzie, I. F. & Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 239(1), 70-76.
- Bergman, I., & Loxley, R. 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Analytical Chemistry**,

35(12), 1961-1965.

- Best, S., Porter, A., Thian, E. & Huang, J. 2008. Bioceramics: past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, 28(7), 1319-1327.
- Beto, J. A. 2015. The role of calcium in human aging. **Clinical Nutrition Research**, 4(1), 1-8.
- Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M. & Kishimura, H. 2008. Antioxidative activity of mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Food Chemistry**, 106(1), 185-193.
- Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P. & Linsenmayer, T. F. 1988. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. **The Journal of Cell Biology**, 106(3), 999-1008.
- Buege, J. A. & Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 53, 32-34.
- Burjanadez, T. V. 2000. New analysis of the phylogenetic change of collagen thermostability. **Biopolymers : Original Research on Biomolecules**, 53(6), 523-528.
- Chen, D., Mu, X., Huang, H., Nie, R., Liu, Z., & Zeng, M. 2014. Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats. **Journal of Functional Foods**, 6, 575-584.
- Chen, K., Yang, Q., Hong, H., Feng, L., Liu, J., & Luo, Y. 2020. Physicochemical and functional properties of maillard reaction products derived from cod (*Gadus morhua* L.) skin collagen peptides and xylose. **Food Chemistry**, 333, 1-10.
- Chen, X., Liang, L., & Han, C. 2020. Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. **LWT - Food Science and Technology**, 131, 1-7.
- Chi, C. F., Cao, Z. H., Wang, B., Hu, F. Y., Li, Z. R., & Zhang, B. 2014. Antioxidant and 495 functional properties of collagen hydrolysates from Spanish Mackerel skin as 496 influenced by average molecular weight. **Molecules**, 19, 11211-11230.
- Chiu, H. F., Hsiao, S. C., Lu, Y. Y., Han, Y. C., Shen, Y. C., Venkatakrisnan, K. & Wang, C. K. 2018. Efficacy of protein rich pearl powder on antioxidant status in a

- randomized placebo-controlled trial. **Journal of Food and Drug Analysis**, 26(1), 309-317.
- Chhum, P., Yu, H., An, B., Doyon, B. R., Lin, Y. S., & Brodsky, B. 2016. Consequences of glycine mutation in the fibronectin - binding sequence of collagen. **Journal of Biological Chemistry**, 291(53), 27073-27086.
- Ciou, D. S., Wu, P. H., Huang, Y. C., Yang, M. C., Lee, S. Y., & Lin, C. Y. 2020. Colorimetric and amperometric detection of urine creatinine based on the ABTS radical cation modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 314, 1-9.
- Crowley, S. V., Gazi, I., Kelly, A. L., Huppertz, T. & O'Mahony, J. A. 2014. Influence of protein concentration on the physical characteristics and flow properties of milk protein concentrate powders. **Journal of Food Engineering**, 135, 31-38.
- da Rosa Machado, C. & Thys, R. C. S. 2019. Cricket powder (*Gryllus assimilis*) as a new alternative protein source for gluten-free breads. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 56, 1-7.
- de Paz-Lugo, P., Lupiáñez, J. A., & Meléndez-Hevia, E. 2018. High glycine concentration increases collagen synthesis by articular chondrocytes *in vitro*: acute glycine deficiency could be an important cause of osteoarthritis. **Amino Acids**, 50(10), 1357-1365.
- Erfanian, A., Rasti, B. & Manap, Y. 2017. Comparing the calcium bioavailability from two types of nano-sized enriched milk using *in-vivo* assay. **Food Chemistry**, 214, 606-613.
- Feist, B. & Mikula, B. 2014. Preconcentration of heavy metals on activated carbon and their determination in fruits by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Food Chemistry**, 147, 302-306.
- Foegeding, E., Lanier, T. & Hultin, H. 1996. Collagen. **Food Chemistry**, 3, 902-906.
- Fu, M., Shen, X., Peng, H., Zhou, Q., Yun, J., Sun, Y., Ho, C. T., Chi, H. & Hou, R. 2020. Identification of acidity makers in roasted sunflower seeds produced from raw materials stored for different periods of time. **LWT- Food Science and Technology**, 188, 1-8.
- Fu, Y., Young, J.F., Rasmussen, M.K., Dalsgaard, T.K., Lametsch, R., Aluko, R.E., & Therkildsen, M. 2016. Angiotensin I - converting enzyme-inhibitory peptides from

- bovine collagen: insights into inhibitory mechanism and transepithelial transport. **Food Research International**, 89, 373-381.
- Gandhi, A. P., Kotwaliwale, N., Kawalkar, J., Srivastav, D. C., Parihar, V. S., & Nadh, P. R. 2001. Effect of incorporation of defatted soyflour on the quality of sweet biscuits. **Journal of Food Science and Technology**. 38(5), 502-503.
- Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 55(12), 1531-1546.
- Gerster, F. M., Vernez, D., Wild, P. P. & Hopf, N. B. 2014. Hazardous substances in frequently used professional cleaning products. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, 20(1), 46-60.
- Girard, B., & Durance, T. (2000). Headspace volatiles of sockeye and pink salmon as affected by retort process. **Journal of Food Science**, 65(1), 34-39.
- Gistelinck, C., Gioia, R., Gagliardi, A., Tonelli, F., Marchese, L., Bianchi, L., Landi, C., Bani, L., Huyaeune, A., Witten P. E., Staes, A., Gevaert, K., De Rocker, N., Menten, B., Malfait, F., Leikin, S., Carra, S., Tenni, R., Rossi, A., De Paepe, A., Coucke, P., Willaert, A., & Forlino, A. 2016. Zebrafish collagen type I: molecular and biochemical characterization of the major structural protein in bone and skin. **Scientific Reports**, 6(1), 1-14.
- Goss, S., Prushko, J., & Bogner, R. 2010. Factors affecting calcium precipitation during neutralisation in a simulated intestinal environment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 99(10), 4183-4191.
- Hamada, M., Nagai, T., Kai, N., Tanoue, Y., Mae, H., Hashimoto, M., Miyoshi, K., Kumagai H. & Saeki, K. 1995. Inorganic constituents of bone of fish. **Fisheries Science**, 61(3), 517-520.
- Hamre, K., Lie, Ø., & Sandnes, K. 2003. Development of lipid oxidation and flesh colour in frozen stored fillets of Norwegian spring-spawning herring (*Clupea herengus* L.) Effect of treatment with ascorbic acid. **Food Chemistry**, 82(3), 447-453.
- Hatae, K., Sato, T., & Yoshimatsu, F. 1980. Effect of green tea infusions on tenderness of bones and intensity of odors in cooked fish. **Journal of Home Economics of Japan**, 31(2), 88-93.
- Hauser, J., Stollberg, E., Reissmann, A., Kaunzinger, I. & Lange, K. W. 2018. Alterations of

- attention and impulsivity in the rat following a transgenerational decrease in dietary omega-3 fatty acids. **Food Science and Human Wellness**, 7(1), 49-56.
- He, G., Yin, Y., Yan, X. & Yu, Q. 2014. Optimisation extraction of chondroitin sulfate from fish bone by high intensity pulsed electric fields. **Food Chemistry**, 164, 205-210.
- Heaney, R. P., Weaver, C. M., Lee Fitzsimmons, M. & Recker, R. R. 1990. Calcium absorptive consistency. **Journal of Bone and Mineral Research**, 5(11), 1139-1142.
- Hoyle, N. T. & Merritt, J. H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, 59(1), 76-79.
- Huynh, N. K., Nguyen, D. H. & Nguyen, H. V. 2020. Reduction of soluble oxalate in cocoa powder by the addition of calcium and ultrasonication. **Journal of Food Composition and Analysis**, 93, 1-4.
- Idowu, A. T., Benjakul, S., Sae-Leaw, T., Sookchoo, P., Kishimura, H., Suzuki, N. & Kitani, Y. 2019. Amino acid composition, volatile compounds and bioavailability of biocalcium powders from salmon frame as affected by pretreatment. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 28(7), 772-780.
- Idowu, A. T., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Pongsetkul, J., Sae-Leaw, T. & Sookchoo, P. 2019. Whole wheat cracker fortified with biocalcium and protein hydrolysate powders from salmon frame: characteristics and nutritional value. **Food Quality and Safety**, 3(3), 191-199.
- Idowu, A. T., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Sae-leaw, T., Suzuki, N., Kitani, Y. & Sookchoo, P. 2020. Effect of alkaline treatment on characteristics of bio-calcium and hydroxyapatite powders derived from salmon bone. **Applied Sciences**, 10(12), 1-12.
- Iglesias, J. & Medina, I. 2008. Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. **Journal of Chromatography A**, 1192(1), 9-16.
- Ignat'eva, N. Y., Danilov, N., Averkiev, S., Obrezkova, M. & Lunin, V. 2007. Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues. **Journal of Analytical Chemistry**, 62(1), 51-57.

- Iranzo, O. 2011. Manganese complexes displaying superoxide dismutase activity: a balance between different factors. **Bioorganic Chemistry**, 39(2), 73-87.
- Isaksson, H., Tolvanen, V., Finnilä, M. A., Iivarinen, J., Tuukkanen, J., Seppänen, K., Arokoski, J. P., Brama, P. A., Jurvelin, J. S. & Helminen, H. J. 2009. Physical exercise improves properties of bone and its collagen network in growing and maturing mice. **Calcified Tissue International**, 85(3), 247-256.
- Ishikawa, M., Mori, S., Watanabe, H. & Sakai, Y. 1987. Softening of fish bone. I. Relation between softening rate and solubilization rate of organic matter from fish bone. **Journal of Food Processing and Preservation**, 11(4), 277-287.
- Jafarpour, A., Gomes, R. M., Gregersen, S., Sloth, J. J., Jacobson, C. & Sørensen, A.-D. M. 2020. Characterization of Cod (*Gadus morhua*) frame composition and its valorization by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, 89, 1-12.
- Jung, W. K., Lee, B. J. & Kim, S. K. 2006. Fish-bone peptide increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats. **British Journal of Nutrition**, 95(1), 124-128.
- Kapook. 2020. **Brownie cracker**. [Online] Available <https://cooking.kapook.com/view/229860.html>. (5 February 2021).
- Kerstetter, J. E., O'Brien, K. O., Caseria, D. M., Wall, D. E. & Insogna, K. L. 2005. The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 90(1), 26-31.
- Kristoffersen, K.A., Liland, K.H., Böcker, U., Wubshet, S.G., Lindberg, D., Horn, S.J., Afseth, N.K. 2019. FTIR-based hierarchical modeling for prediction of average molecular weights of protein hydrolysates. **Talanta**, 205, 1-8.
- Kurabayashi, M. 2012. Is calcium supplement useful in aged persons? calcium supplement doesn't reduce the fracture and vascular risk in aged persons. **Clinical Calcium**, 22(5), 736-739.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227(5259), 680-685.
- Lassoued, I., Mora, L., Barkia, A., Aristoy, M. C., Nasri, M., & Toldrá, F. 2015. Bioactive

- peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Proteomics**, 128, 8-17.
- Li, Z. R., Wang, B., Chi, C. f., Zhang, Q. H., Gong, Y. d., Tang, J. J., Luo, H. y. & Ding, G. f. 2013. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*). **Food Hydrocolloids**, 31(1), 103-113.
- Liu, X., Luo, Q., Rakariyatham, K., Cao, Y., Goulette, T., Liu, X., & Xiao, H. 2016. Antioxidation and anti-ageing activities of different stereoisomeric astaxanthin *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Functional Foods**, 25, 50-61.
- Lorieau, L., Le Roux, L., Gaucheron, F., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D. & Floury, J. 2018. Bioaccessibility of four calcium sources in different whey-based dairy matrices assessed by *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, 245, 454-462.
- Malde, M., Graff, I., Siljander-Rasi, H., Venäläinen, E., Julshamn, K., Pedersen, J. & Valaja, J. 2010. Fish bones—a highly available calcium source for growing pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 94(5), 66-76.
- Megias, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J., 2007. Affinity purification of copper chelating peptides from Chickpea protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55(10), 3949-3954.
- Mezzo. 2021. **Brownie**. [Online]. Available <https://www.mezzo.co/products/brownies-cheese-brownies/brownie-01.html>. (5 February 2021).
- Miller, D. D., Schricker, B. R., Rasmussen, R. R., & Van Campen, D. 1981. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 34(10), 2248-2256.
- Mohamed, M., Yusup, S. & Maitra, S. 2012. Decomposition study of calcium carbonate in cockle shell. **Journal of Engineering Science and Technology**, 7(1), 1-10.
- Monma, H. & Kanazawa, T. 1978. Wet-process formation of nonstoichiometric hydroxyapatite from tricalcium phosphate. **Yogyo-Kyokai-Shi**, 86(2), 72-79.
- Offengenden, M., Chakrabarti, S., & Wu, J. 2018. Chicken collagen hydrolysates differentially mediate anti-inflammatory activity and type I collagen synthesis on

- human demal fibroblasts. **Food Science and Human Wellness**, 17(2) 138-174.
- Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M. W., Bell, J., Schexnayder, M. A. & Losso, J. N. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). **Food Chemistry**, 88(4), 495-501.
- Pal, A., Paul, S., Choudhury, A. R., Balla, V. K., Das, M. & Sinha, A. 2017. Synthesis of hydroxyapatite from *Lates calcarifer* fish bone for biomedical applications. **Materials Letters**, 203, 89-92.
- Park, S. H., & Jo, Y. J. 2019. Static hydrothermal processing and fractionation for production of a collagen peptide with anti-oxidative and anti-aging properties. **Process Biochemistry**, 83, 176-182.
- Piccirillo, C., Silva, M., Pullar, R., Da Cruz, I. B., Jorge, R., Pintado, M. & Castro, P. M. 2013. Extraction and characterisation of apatite-and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. **Materials Science and Engineering: C**, 33(1), 103-110.
- Richardson, A. M., Tyuftin, A. A., Kilcawley, K. N., Gallagher, E., O'Sullivan, M. G., & Kerry, J. P. 2018. The impact of sugar particle size manipulation on the physical and sensory properties of chocolate brownies. **LWT- Food Science and Technology**, 95, 51-57.
- Ross, C. F. & Smith, D. M. 2006. Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 5(1), 18-25.
- Sae-Leaw, T. & Benjakul, S. 2015. Physico-chemical properties and fishy odour of gelatin from seabass (*Lates calcarifer*) skin stored in ice. **Food Bioscience**, 10, 59-68.
- Saiga, A. I., Tanabe, S., & Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(12), 3661-3667.
- Saito, K., Takenouchi, Y., Kunisaki, N., & Kimura, S. 2001. Complete primary structure of rainbow trout type I collagen consisting of $\alpha 1(I)\alpha 2(I)\alpha 3(I)$ heterotrimers. **European Journal of Biochemistry**, 268, 2817-2827.
- Saiyasombat, W., Duangteraprecha, S. & Opas, P. 2014. The quality of dicloxacillin

- sodium capsules in Thailand. **Bulletin of the Department of Medical Sciences**, 56(2), 100-108.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, 31(10), 1949-1956.
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., Itoh, Y., & Shimizu, Y. 1988. Isolation of type I and V collagens from carp muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry**, 90, 155-158.
- Sattang, S., Tongsir, S., Amornlerdpisan, D. & Meng-umphan, K. 2018. Effect of fish oil and *Spirogyra* sp. supplement on the flesh quality and maturity of Buksiam hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey, 1930 × *Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878). **Journal of Agricultural Research and Extension**, 35(2 Suppl.), 1-10.
- Spiro, M. & Griffith, W. P. 1997. The mechanism of hydrogen peroxide bleaching. **Textile Chemist and Colorist**, 29(11), 12-13.
- Stadtman, E. R. 1991. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 54(6), 1125-1128.
- Schnider, S. L. & Kohn, R. 1981. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. **The Journal of Clinical Investigation**, 67(6), 1630-1635.
- Schumacher, M. A., Mizuno, K. & Bächinger, H. P. 2006. The crystal structure of a collagen - like poly peptide with 3(S) - hydroxyproline residues in the Xaa position froms a standard 7/2 collagen triple helix. **Journal of Biological Chemistry**, 281(37), 27566-27574
- Shoulders, M. D. & Raines, R. T. 2009. Collagen structure and stability. **Annual Review of Biochemistry**, 78, 929-958.
- Stoilov, I., Starcher, B. C., Mecham, R. P., & Broekelmann, T. J. 2018. Measurement of elastin collagen and total protein levels in tissues. **Method in Cell Biology**, 143, 133-136
- Sutheechai, S. & Sudchada, P. 2012. Mineral and bone disorder in chronic kidney disease. **Srinagarind Medical Journal**, 27(4), 415-423.
- Taepongsorat, L. 2014. Osteoporosis: epidemiology, causes, diagnosis, treatments.

- Journal of Science and Technology Maharakham University*, 33(5), 526-526.
- Taylor, W. R. 1967. An enzyme method of clearing and staining small vertebrates. **Proceedings of the United States National Museum**.
- Thai, F. 1995. **Thai Recommended Daily Intakes–Thai RDI**: Nonthaburi.
- The statesman. 2019. **Collagen**. [Online] Available https://www.thestatesman.com/supplements/science_supplements/collagens-provider-strength-1502731918.html. (8 August 2020)
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S. & Shahidi, F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food Chemistry**, 103(4), 1385-1394.
- Thomas, C. 1971. Sources of flavor in poultry skin. **Food Technology**, 25, 109-115.
- Toppe, J., Albrektsen, S., Hope, B., & Aksnes, A. 2007. Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 146(3), 395-401.
- Tsopmo, A., Diehl-Jones, B. W., Aluko, R. E., Kitts, D. D., Elisia, I., & Friel, J. K. 2009. Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties. **Pediatric Research**, 66(6), 614-618.
- Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A. M., Olano, E., Davis, P. A., Packer, L. & Cross, C. E. 2004. *In vivo* ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin. **Free Radical Biology and Medicine**, 36(5), 673-681.
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M., González-Álvarez, J. & Antorrena, G. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial Crops and Products**, 28(3), 279-285.
- Vojdani, F. 1996. Solubility. In G. M. Hall (Ed.), **Methods of testing protein functionality (1st ed.)**. (pp. 11-60) Great Britain: St Edmundsbury Press.
- VYTRÁSOVÁ, L. Č.-I. B.-J. 2006. Effects of the principal ingredients of biscuits upon water activity. **Journal of Food and Nutrition Research**, 45(1), 39-43.

- Vujasinović-Stupar, N., Novković, S. & Jezdić, I. 2009. Supplementation with bio-calcium from shells *Pinctada maxima* in postmenopausal women with decreased mineral bone density: Pilot study. **Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo**, 137(9-10), 518-523.
- Wang, B., Wang, Y.M., Chi, C.F., Luo, H.Y., Deng, S.G., & Ma, J.Y. 2013. Isolation and characterization of collagen and antioxidation collagenpeptides from scales of Croceine Croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Marine Drugs**, 11(11), 4641-4661.
- Wijayanti, I., Benjakul, S. & Sookchoo, P. 2020. Preheat-treatment and bleaching agents affect characteristics of bio-calcium from Asian sea bass (*Lates calcarifer*) Backbone. **Waste and Biomass Valorization**, 1-12.
- Wongdee, K., Teerapornpuntakit, J., Sripong, C., Longkunan, A., Chankamngoen, W., Keadsai, C., Kraidith, K., Krishnamra, N. & Charoenphandhu, N. 2016. Intestinal mucosal changes and upregulated calcium transporter and FGF-23 expression during lactation: Contribution of lactogenic hormone prolactin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 590, 109-117.
- Wongtarue, K., Rongrat, C., Senphan, T., Khiewnavawongsa, S., & Yarnpakdee, S. 2020. Dietary calcium from pearl oyster (*Pinctada maxima*) shell powder as affected by thermal treatment: Characterization and its application in surimi Gel. **Burapha Science Journal**, 25(3), 1262-1277.
- World Health Organization. 2018. WHO recommendation: calcium supplementation during pregnancy for prevention of pre-eclampsia and its complications. Geneva27: **Switzerland**.
- Wu, H. C., Chen, H. M. & Shiau, C. Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, 36(9-10), 949-957.
- Yamazaki, S., Su, Y., Maruyama, A., Makinoshima, H., Suzuki, J., Tsuboi, M., & Ishii, G. 2020. Uptake of collagen type I via macropinocytosis cause mTOR activation and anti-cancer drug resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 526(1), 191-198.
- Zamorano-Apodaca, J. C., García-Sifuentes, C. O., Carvajal-Millán, E., Vallejo-Galland, B., Scheuren-Acevedo, S. M., & Lugo-Sánchez, M. E. 2020. Biological and functional

properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species. **Food Chemistry**, 331, 1-36.

Zhou, J., Hu, N., Wu, Y. L., Pan, Y. J., & Sun, C. R. 2008. Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant properties of acidic polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, 9(9), 721-727.





ภาคผนวก



1. การวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้นหลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก
2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ช้าจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง
5. นำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาทีและทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
7. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

เมื่อ M_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

M_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์การย่อยโปรตีนประกอบด้วยเตาเผา และเครื่องดักจับไอกรด
2. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร และขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ปิเปต ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

5. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
6. ลูกแก้ว
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)

อัตราส่วน 1:10

2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40
4. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4
5. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N
6. อินดิเคเตอร์เป็นสารผสมระหว่างเมทิลเรด เมธิลีนบลู และโบรโมครีซอลกรีน

วิธีการวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน
2. ใส่สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟต ปริมาณ 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกปริมาณ 20 มิลลิลิตร
4. วางหลอดย่อยตัวอย่างในเตาย่อย แล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบขวดใส่ต่าง และเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย
5. เปิดสวิทช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อยแล้วตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 400 องศาเซลเซียส ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส
6. ปลดยทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรท

1. จัดอุปกรณ์กลั่นแล้วเปิดสวิทช์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น
2. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์แล้วนำไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่น จุ่มลงในสารละลายกรด
3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ทำปฏิกิริยาเกินพอ สังเกตให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขุ่น

4. กลับให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 125 มิลลิลิตร
5. ไตเตรทสารละลายที่กลับได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง

6. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(A - B) \times N \times 1.4007 \times F}{W}$$

เมื่อ	A	คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
	B	คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)
	N	คือ ความเข้มข้นของกรด (N)
	F	คือ แฟคเตอร์ (6.25)
	W	คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. Soxhlet apparatus
2. หลอดใส่ตัวอย่าง
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. โถดูดความชื้น

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์หรือเฮกเซน

วิธีการวิเคราะห์

1. ใส่ขวดก้นกลมสำหรับการหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก 3-5 กรัม ท่อให้มัดขีดใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง

3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงใน Soxhlet เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดหาไขมันประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

4. ประกอบอุปกรณ์ชุดกลั่นไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทช์ให้ความร้อน

5. ปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

6. เมื่อครบ 6 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจาก Soxhlet ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจาก Soxhlet ลงในขวดก้นกลมจนหมด

7. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ

8. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

9. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำ นานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

10. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W_2 \times 100}{W_1}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างหลังอบ

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก AOAC., 2000)

อุปกรณ์

1. Crucible
2. Muffle furnace (เตาเผา)
3. Hot plate
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. เเผถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

2. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1. จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ (ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W1)

3. ชั่งตัวอย่างอย่างละเอียดประมาณ 2 กรัม (S) ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ เผาบนเตาไฟฟ้า จนหมดควัน

4. นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีเทาอ่อน หรือสีขาวสม่ำเสมอ นำออกจากเตาเผา เก็บในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

5. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 4. (ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W2)

6. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W_2 - W_1) \times 100}{S}$$





1. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• (DPPH radical scavenging activity)

อุปกรณ์

1. ปิเปต
2. ปีกเกอร์
3. วอลลุ่มฟาสก์
4. ลูกยาง
5. แท่งแก้วคนสาร
6. ซ้อนตักสาร
7. หลอดทดลอง
8. ที่วางหลอดทดลอง

เครื่องมือ

1. Spectrophotometer
2. Vertex

สารเคมี

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
2. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)
3. Methanol
4. น้ำกลั่น

เตรียมตัวอย่าง

1. บดตัวอย่างให้ละเอียด
2. ละลายตัวอย่างในน้ำกลั่น (ความเข้มข้นของตัวอย่าง 10 – 40 mg/ml)
3. เขย่า ผสมให้เข้ากัน

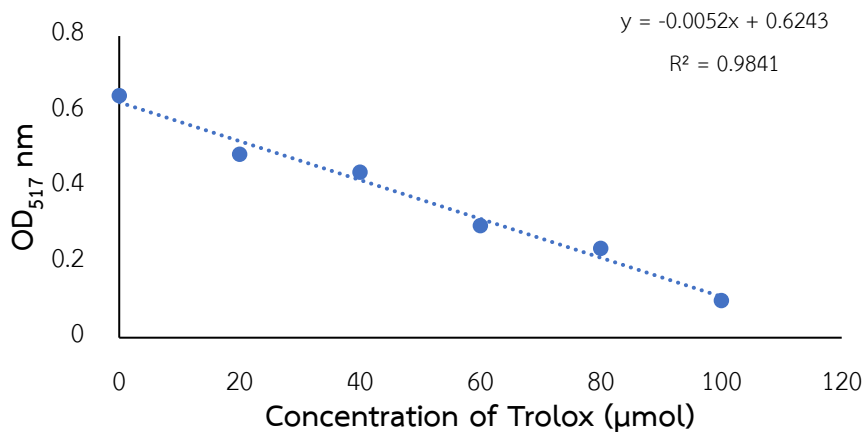
วิธีการทดลอง

1. ปิเปตตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ปิเปต 1.5 มิลลิลิตร ของ 0.15 mM DPPH ที่ละลายในเมทานอล 95% ลงในหลอด

ทดลอง

3. ผสมให้เข้ากัน
4. บ่มในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

6. รายงานกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในหน่วย $\mu\text{mol Trolox equivalents (TE)/g}$ sample



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐาน DPPH radical scavenging activity

2. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS• (ABTS radical scavenging activity)

ศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีของ Binsan และคณะ (2008)

อุปกรณ์

1. ปีเปต
2. ไมโครปีเปต
3. หลอดทดลอง
4. ที่วางหลอดทดลอง
5. ปีกเกอร์
6. ซ้อนตักสาร
7. แ่งแก้วคนสาร

เครื่องมือ

1. Spectrophotometer
2. Vertex

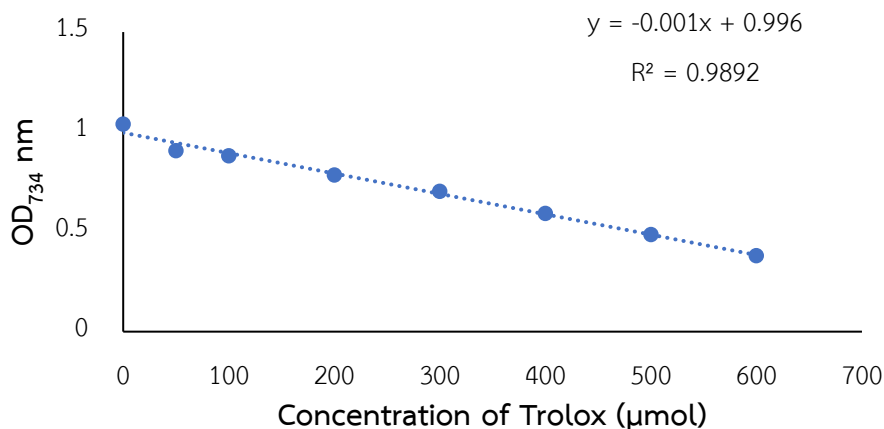
สารเคมี

1. 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)

2. Potassium persulphate
3. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)

วิธีการทดลอง

1. เตรียม Stock Solution ของสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 7.4 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ที่ความเข้มข้น 2.6 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 (v/v)
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด นาน 12 ชั่วโมง
3. ก่อนใช้งานเจือจางสารละลายโดยผสมสารละลาย stock solution ของ ABTS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล 50 มิลลิลิตร ได้เป็น working solution ABTS
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 1.1 ± 0.02
5. ปิเปตตัวอย่าง 150 μ l และ working solution ABTS 2850 μ l ผสมให้เข้ากัน
6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด นาน 2 ชั่วโมง
7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร
8. รายงานผลในหน่วย μ mol Trolox equivalent / g sample



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐาน ABTS radical scavenging activity

3. ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric reducing antioxidant power, FRAP)

ศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกของสารต้านอนุมูลอิสระ ดัดแปลงตามวิธีของ Benzie และ Strain (1996)

อุปกรณ์

1. ปิเปต
2. ไมโครปิเปต
3. หลอดทดลอง
4. ที่วางหลอดทดลอง
5. ปีกเกอร์
6. ซ้อนตักสาร
7. แ่งแก้วคนสาร

เครื่องมือ

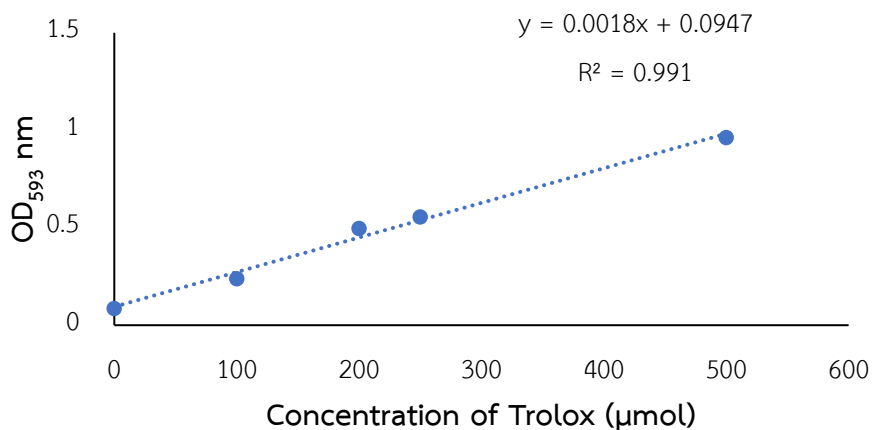
1. Spectrophotometer
2. Vertex

สารเคมี

1. Acetate buffer pH 3.6
2. 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)
3. HCl
4. $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
5. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)

วิธีการทดลอง

1. ผสมสาร working solution โดยการผสมอะซิเตตบัฟเฟอร์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, TPTZ solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร
2. เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. ปิเปตตัวอย่าง 150 μl ผสมกับ working solution 2850 μl
4. เขย่าให้เข้ากัน และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร
6. รายงานผลในหน่วย $\mu\text{mol Trolox equivalent} / \text{g sample}$



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐาน Ferric reducing antioxidant power, FRAP

4. ความสามารถในการจับโลหะเฟอร์รัสไอออน (Metal chelating activity on ferrous ion (Fe²⁺))

ศึกษาสามารถในการจับโลหะเฟอร์รัสไอออนดัดแปลงจากวิธีของ Thiansilakul และคณะ (2007)

อุปกรณ์

1. ปิเปต
2. ไมโครปิเปต
3. หลอดทดลอง
4. ที่วางหลอดทดลอง
5. ปีกเกอร์
6. ซ้อนตักสาร
7. แ่งแก้วคนสาร

เครื่องมือ

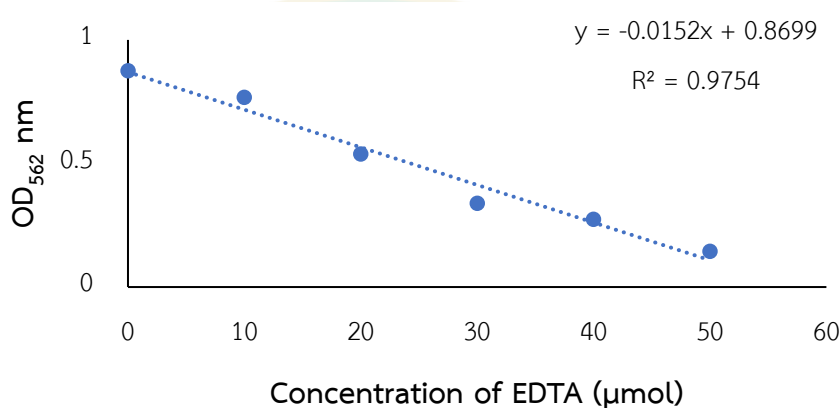
1. Spectrophotometer
2. Vertex

สารเคมี

1. FeCl₂
2. Ferrozine
3. EDTA

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตตัวอย่าง 4.7 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติม FeCl₂ ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ Ferrozine ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงไปและผสมให้เข้ากัน
3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร
5. รายงานผลในหน่วย $\mu\text{mol EDTA equivalent} / \text{g sample}$



ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐาน Metal chelating activity on ferrous ion (Fe^{2+})

5. ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline content)

วิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน ดัดแปลงจากวิธีของ Bergman and Loxley (1963)

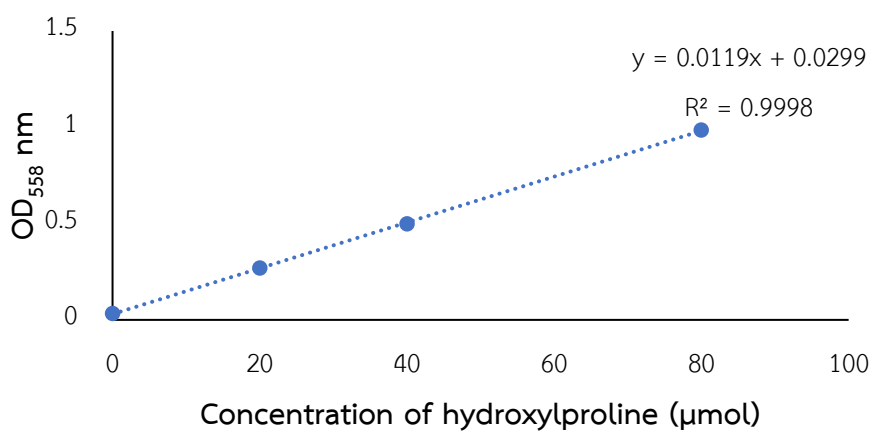
วิธีการทดลอง

1. ทำการย่อยตัวอย่างด้วย 6M HCl ที่อุณหภูมิ 110 °C นาน 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างจะใส อัตราส่วน 1:10
2. ทำตัวอย่างให้ใสด้วย activated charcoal แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4
3. ตัวอย่างส่วนที่กรองได้นำมาทำให้เป็นกลาง pH 6.0 – 6.5 ด้วย NaOH
4. ผสมตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับ isopropanol 0.2 มิลลิลิตร
5. จากนั้นเติม oxidant solution 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. จากนั้นเติม Ehrlich's reagent solution 1.3 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน
7. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 25 นาที
8. เมื่อครบเวลา ทำให้เย็นโดยเปิดน้ำผ่าน 2 – 3 นาที

9. คู่มือหลอดตัวอย่าง กับหลอดมาตรฐาน ถ้าเข้มข้นกว่าอาจจะต้องเจือจาง 5 เท่า ด้วย isopropanol

10. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 558 nm

11. รายงานผลเป็น mg/g sample



ภาพผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐาน Hydroxylproline





ภาคผนวก ค

กระบวนการผลิตไบโอแคสซีมจากกระดูกปลาลูกผสมบึงสยาม



1. กระดุกปลาสด



2. กระดุกปลาผ่านกระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูง



3. กระดุกปลาผ่านกระบวนการแช่น้ำด่าง KOH 1%



4. กระดุกปลาผ่านกระบวนการแช่ตัวทำละลายเอทานอล

5. กระดุกปลาผ่านกระบวนการฟอกสีด้วย H₂O₂ 1%

6. ผงไบโอแคลเซียมจากกระดุกปลาลูกผสมบึงสยาม

ภาพผนวกที่ 6 กระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดุกปลาลูกผสมบึงสยาม

ภาพแสดงบรรจุภัณฑ์ต้นแบบขวด (บรรจุภัณฑ์ขั้นแรก) และกล่อง (บรรจุภัณฑ์ขั้นที่สอง) ของผลิตภัณฑ์ไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล แสดงดังภาพผนวกที่ 8 ซึ่งบรรจุภัณฑ์เป็นขวดพลาสติกสีชาชนิดโพลีโพรไพลีน (Polypropylene, PP) ขนาด 100 มิลลิลิตร ความกว้าง 5.5 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฝา 38 มิลลิเมตร ในขณะที่บรรจุภัณฑ์ขั้นที่สองเป็นกล่องกระดาษมีขนาดกล่องกว้าง × ยาว × สูง เท่ากับ 7.5 × 8 10.5 เซนติเมตร ขนาดบรรจุจำนวน 60 เม็ดต่อขวด โดยบรรจุร่วมกับซองดูดซับความชื้นลงในขวดบรรจุภัณฑ์ ขนาด 1 กรัม ความกว้าง 2 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร



ภาพผนวกที่ 7 ผลิตภัณฑ์ต้นแบบไบโอแคลเซียมบรรจุแคปซูล (A) ขวดบรรจุภัณฑ์ขั้นแรก (B) และกล่องบรรจุภัณฑ์ขั้นที่สอง (C)



ภาคผนวก ง
นำเสนอผลงาน

การนำเสนอผลงาน เรื่อง Production and Characterization of BioCalcium from Hybrid Catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) Bone ในงานประชุมวิชาการ The 12th International Conference on Science, Technology and Innovation for Sustainable Well-Being (STISWB 2020 #12) ในระหว่างวันที่ 24 กรกฎาคม 2563 จัดโดยมหาวิทยาลัยศิลปากร ทางระบบออนไลน์ ด้วยโปรแกรม Microsoft team



ภาพผนวกที่ 8 Full paper



Production and Characterization of Bio-Calcium from Hybrid Catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) Bone

Niwet J¹ Mangumphon K² Thammakan N³ Deangprok W¹ Sriket C⁴ and
Senphan T^{1*}

¹Program in Food Science and Technology, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiangmai 50290, Thailand

²Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiangmai 50290, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiangmai 50290, Thailand

⁴Food and Agricultural Biotechnology Program, Department of General Science and Liberal Arts, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus, Pathiu, Chumphon, 86160, Thailand

*corresponding author; e-mail: theeraphol_s@mju.ac.th, Tel: +66-53-875030 ext 207,
Fax: +66-53-87503

Abstract

Biocalcium (BC) obtained can be used as the supplement of calcium to alleviate the insufficient calcium intake associated with osteoporosis. Biocalcium from hybrid catfish bone was prepared using with different treatments. Cleaning by high pressure water jet cleaner (PB), followed by alkaline treatment (RP) could remove remaining meat and lipids. BC powder had decreased protein and lipid content ($p < 0.05$). Bleaching using hydrogen peroxide resulted in the increase in whiteness (L^* -value) with decreases in redness (a^* -value) and yellowness (b^* -value). RP and BC powders showed a characteristic peak of hydroxyapatite in X-ray diffraction patterns. Amides I and II peaks in Fourier transform infrared spectrum, hydroxyproline, and protein were detected only in the RP and BC powders. However, defatting using ethanol was able to reduce thiobarbituric acid reactive substances values. Thus, the combined treatments were recommended for production of biocalcium with improved quality.

Keywords: Bio calcium, Fish bone, hybrid catfish

1. Introduction

Calcium (Ca) is one of the important components of the human body. Calcium is an important component of teeth and bones. Calcium deficiency is a worldwide problem [1]. Chronic calcium deficiency caused by

insufficient intake or poor absorption in the intestines. Resulting in reduced bone mass and osteoporosis. Finding new sources of calcium is another option to increase the amount of calcium on the needs of the body. especially women after menopause, the body

will have more calcium breakdown from the bones due to lack of estrogen and increase the risk of osteoporosis [2]. It is reported that the calcium crystals in the fish bone are in the form of hydroxyapatite crystals, which are the same form found in human bones [3]. While the eggshell and oyster shell is in the form of calcium carbonate [4]. This natural calcium is much cheaper than the calcium chelate group, including calcium phosphate and is water-soluble and is well absorbed into the body [3, 4].

Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*) is the largest herbivorous freshwater. This fish habits in the Mekong river area. Problems on the growth development and aquatic environment make the population of this fish decrease [5]. Recently, the aquaculture of this fish was successfully development a new species of hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) [5, 6], thus raised this fish to economic fish for fishery production. The fish was used for production of fillet and frozen products. During fillet processing, numerous wastes, both solid and liquid form, are generated [7]. The solid wastes constitute 40–50% of the original raw material, depending on the processing used. These wastes are a mixture of bone, heads, viscera and skin [5, 7]. Although the nutritional values of these wastes are fairly high, these useful resources have been mainly used as fish meal or fertilizer with low value [8]. However, bones of this fish constitute approximately 40% of total fish biomass, are generated as byproducts [9]. Those bones can serve as a promising source of calcium. Bone is composed of 34–36% calcium, based on total ash content [10] and is also rich in collagen and chondroitin [11]. Fish bone has a nutritional value that is rich in important minerals such as calcium and phosphorus. It also has a lot of collagen and proteins. Previous studies have shown that some amino acids found in collagen, such as proline and hydroxyproline, can stimulate calcium absorption through the intestines in animals [12].

Fish bone, particularly from fillet process, has the limited applications, caused by strong

fishy odor. The problematic fishy odor was more likely caused by the blood and lipids retained in the bone, in which lipid oxidation can take place. This leads to off-odor or rancidity, thereby lowering the acceptability of consumers. Therefore, appropriate treatment is a means to bring about biocalcium powder from hybrid catfish bone having whiter color without fishy odor. Biocalcium obtained can be used as the supplement of calcium to alleviate the insufficient calcium intake associated with osteoporosis [13]. According to Benjakul et al. [14], biocalcium from pre-cooked skipjack tuna bone was prepared using several treatments. Cleaning by high pressure water jet cleaner, followed by alkaline treatment could remove remaining meat and lipids, thereby increasing levels of Ca and P. Biocalcium with improved color and odor along with increased solubility in gastrointestinal tract can be used as an alternative calcium supplement to tackle the inadequate intake of dietary calcium. Thus, fish bones can be used as a natural source of calcium in food, feed or for supplement. Thus, hybrid catfish is considered a promising source for biocalcium production due to its abundance.

Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of different treatments on properties of biocalcium from hybrid catfish bone.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

2-Thiobarbituric acid was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). 1,1,3,3-tetramethoxypropane was procured from SigmaAldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Ethanol, potassium hydroxide and hydrogen peroxide were obtained from Lab-Scan (Bangkok, Thailand).

2.1 Collection and preparation of bone

Hybrid catfish bone obtained from the Life Farm Land Company Limited, Chiang Mai Province. Bones were placed in polyethylene bag and transported to the Division of Food Science and Technology, Maejo University, Chiangmai within 1 h. All



samples were kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (not longer than 1 month).

2.2 Treatments of hybrid catfish bone

2.2.1 Preparation

Bone samples were subjected to washing using a high pressure water jet cleaner (Zinsano Andaman, Bangkok, Thailand) at a pressure of 120 bar with a flow rate of 360 L/h for 1–2 min. The resulting prepared bones were defined as “PB”

2.2.2 Removal of non-collagen proteins

PB were soaked in 1.5 % M KOH solution with a matter/ solution ratio of 1:10 (w/v) at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min. The mixture was stirred at a speed of 150 rpm with an overhead stirrer equipped with a propeller (RW 20.n, IKA-Werke GmbH & CO.KG, Staufen, Germany). KOH solution was drained and the treated CB were washed with ten volumes of running water for 5 min with continuous stirring. The samples were then washed with running water again until the pH of wash water became neutral. The obtained bones were dried using a rotary tray dryer at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h., then reduce the sample size with a grinder to 3-4 millimeters. The resulting bone was defined as non-collagen protein removal from bone “PR”.

2.2.3 Removal of lipids

PR were subsequently soaked in ethanol with a matter/ solution ratio of 1:10 (w/v) at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and continuously stirred for 60 min. Solvent used was drained and the same volume of ethanol was replaced. After stirring and draining, the samples were allowed to stand at room temperature until dried and free of hexane odor. The resulting bone was defined as removing of lipid from bone “RL”.

2.2.4 Bleaching

RL were soaked in 1% (v/v) hydrogen peroxide with a matter/solution ratio of 1:10 (w/v) at room temperature for 30 min with a continuous stirring. Thereafter, the samples were washed thoroughly with ten volumes of running water. Washing was performed for

3×. Then, the sample was dried in tray dryer at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 h. After that, fish bone samples were ground into a powder using a pin mill. The resulting bone powder was defined as bio-calcium powder “BC”

2.3 Physical properties

2.3.1 %Yield of biocalcium

The yield was calculated and expressed as the percentage of biocalcium.

2.3.2 Color determination

The color of MSO samples will be determined using a and reported in the CIE system, including L^* , a^* and b^* , representing lightness, redness / greenness, yellowness / blueness, respectively. ΔE^* (total difference of color) will be also calculated using the following equation:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

where ΔL^* , Δa^* and Δb^* are the differences between the colour parameter of the samples and the colour parameters of the white standard ($L^* = 92.85$, $a^* = -1.20$, $b^* = 0.46$).

2.4 Proximate analysis

PB, PR, RL and BC from hybrid catfish bone were analyzed for moisture, ash, fat, fiber and protein contents according to the method of AOAC [15]. The values were expressed as % (wet weight basis).

2.5 X-ray diffraction analysis

The phase composition of samples was determined by X-ray diffraction (XRD) using an X-ray Diffractometer (X' Pert MPD, PHILIPS, Eindhoven, the Netherlands), with Cu K- α radiation. A scan speed of 38/min with a step of 0.058 between 58 and 908 at 40 kV and 30 mA was used. The phases were identified using JCPDF files as a standard and using file No. 01–086-0740 and 01–084-1998 for the PB and BC powders, respectively. Percentage of crystallinity was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Crystallinity} = [A(\text{peak}) / A(\text{total})] \times 100$$

2.6 Fourier transform infrared spectroscopic analysis

Fourier transform infrared (FTIR) spectra of powder samples were determined using an FTIR spectrometer (Model EQUINOX 55, Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a deuterated L-alanine tri-glycine sulfate (DLATGS) detector, as described by Sae-Leaw, Benjakul, and O'Brien (2016). The horizontal attenuated total reflectance accessory (HATR) was mounted into the sample compartment. The internal reflection crystal (Pike Technologies, Madison, WI), made of zinc selenide had a 45° angle of incidence to the IR beam. Spectra were acquired at a resolution of 4 cm⁻¹, and the measurement range was 4,000–400 cm⁻¹ (mid-IR region) at room temperature. Automatic signals were collected in 32 scans at a resolution of 4 cm⁻¹ and were compared to a background spectrum recorded from the clean empty cell at 25 °C. An analysis of spectral data was carried out using the OPUS 3.0 data collection software program (Bruker).

2.7 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS were determined as described by Buege and Aust [16]. Lipid sample (0.5 g) was mixed with 2.5 ml of a solution containing 0.375% thiobarbituric acid (w/v), 15% trichloroacetic acid (w/v) and 0.25 M HCl. The mixture was heated in boiling water (95–100 °C) for 10 min to develop a pink colour, cooled with running tap water and centrifuged at 3600 g at 25 °C for 20 min. The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm using a spectrophotometer. A standard curve was prepared using 1,1,3,3-tetramethoxypropane at the concentrations ranging from 0 to 6 ppm. TBARS was calculated and expressed as mg malonaldehyde/kg sample.

2.6 Statistical Analysis

All experiments were run in triplicate. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and mean comparisons were carried out by Duncan's multiple range test.

For pair comparison, T-test was used [13]. Analysis was performed using the SPSS package (SPSS for windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

3. Results and discussion

3.1 %Yield of biocalcium powder

%Yield of biocalcium powders from hybrid catfish bone are shown in Table 1. The yield of resulting powder, approximately 48.19%, was obtained. These results indicate that the purity and yield of biocalcium powders from hybrid catfish bone waste is comparable to commercial chemicals. Wulandari and Kusumasari [17] report that the yields of bone powder from Milkfish bone are 67.57%, 39.67%, and 50.87%, for water, alkaline, and acidic extraction methods, respectively. Nevertheless, the yield of bone recovery from hoki frame was treated by mackerel intestine crude enzyme for 6 h under the optimum reaction conditions, the yield of bone recovery was approximately 90%. Compared to Alcalase, trypsin, achymotrypsin and Neutrase [18].

Table 1. %Yield of biocalcium powders from hybrid catfish bone.

Sample	% yield
Bio calcium powder	48.19 ± 6.18

3.2 Chemical composition

Chemical composition of hybrid catfish bone with different treatments are shown in Table 2. Among all samples, PB showed the highest Moisture, protein, lipid and ash contents, compared with others ($p < 0.05$). With cleaning and removal of non-collagenous proteins, ash content became more concentrated as shown by the increases ash contents in RR, RL and BC. This was more likely due to the removal of remaining meat as well as lipids during cleaning of cut bones. The use of solvent for lipid removal and bleaching agents had therefore impact on

moisture, protein, lipid and ash contents. BC contained moisture, protein, lipid and ash contents at levels of 1.42%, 2.86%, 0.07% and 68.15%, respectively. The chemical composition of fish bones varies with species, season, size and fish age [14]. Generally, fish bone is abundant in minerals. Hoki bone powder contained 28.0% protein, 1.94% lipid and 69.46% ash, respectively [19].

Table 2. Chemical composition of hybrid catfish bone with different treatments.

Samples	Moisture	Protein	Lipid	Ash
PB	4.70 ± 0.46 ^{***}	10.46 ± 0.96 ^a	2.46 ± 0.07 ^a	46.77 ± 2.86 ^c
RP	4.64 ± 3.60 ^a	7.26 ± 0.10 ^b	1.93 ± 0.09 ^b	59.54 ± 3.71 ^b
RL	4.41 ± 2.67 ^a	6.17 ± 0.18 ^c	0.13 ± 0.03 ^c	63.99 ± 2.90 ^{ab}
BC	1.42 ± 0.45 ^a	2.86 ± 0.13 ^d	0.07 ± 0.03 ^d	68.15 ± 3.60 ^a

*Means ± SD (n=3).

**Different letters in the same column indicate significant differences (p < 0.05).

3.3 Color

Color of hybrid catfish bone with different treatments expressed as L*, a* and b*-values is shown in Table 3. PB had the lowest L*-value, while had the highest b*-value (redness), compared to other samples (p<0.05). After cutting and cleaning using a high pressure water jet, bone became whiter in color as indicated by sharp increase in L*-value. However, the slight decrease in b*-value was observed. After alkaline treatment, remaining proteins, especially heme proteins, were removed to a higher extent. This resulted in the improved whiteness of bone and lowered yellowness (b*-values). For RL in which ethanol was used for defatting, the increase in L*-value was also found and the decreases in b* value was obtained. Leaching of coloring lipids by ethanol could improve the color of bone. When bleaching agents, hydrogen peroxide, was used, whiteness was increased, while yellowness was decreased,

reconfirming that the pigments might be oxidized or destroyed by this agent. Decomposition of H₂O₂ results in the formation of oxidizing agent, which is able to destroy chromatophore. OH• is a strong nucleophile with the potential in breaking bonds of chromatophores. As a result, chromatophores were destroyed or could not absorb the visible light [14]. The marked decrease in ΔE*-value was also observed in BC.

Table 2. Color values of hybrid catfish bone with different treatments.

Samples	L*	a*	b*	ΔE
PB	37.59 ± 0.05 ^{d**}	-0.94 ± 0.01 ^b	3.85 ± 0.01 ^a	37.70 ± 0.04 ^d
RP	39.00 ± 0.00 ^c	-0.82 ± 0.01 ^d	3.73 ± 0.01 ^b	39.09 ± 0.00 ^c
RL	40.37 ± 0.00 ^b	-1.05 ± 0.01 ^a	3.37 ± 0.00 ^c	40.42 ± 0.01 ^b
BC	40.97 ± 0.01 ^a	-0.86 ± 0.01 ^c	3.17 ± 0.01 ^d	41.00 ± 0.01 ^a

*Means ± SD (n=3).

**Different letters in the same column indicate significant differences (p < 0.05).

3.4 XRD patterns of powders

The XRD patterns for the PB and BC powders are shown in Figure 2. The diffraction peaks of the BC powder at angles 25.888, 32.188, 39.788, 47.788, 49.528, and 53.208 are consistent with the crystalline phase of HA (JCPDF: 01-084-1998). The resulting data confirmed the phase purity and high crystallinity degree of the BC sample as a consequence of the transformation of the initial bone matrix to a well-crystallized HA phase. Benjakul et al. [13] report that bioactive and calcined bone powders from the bones of precooked skipjack tuna had a characteristic peak of hydroxyapatite in X-ray diffraction patterns, in which the crystallinities of the bioactive and calcined bone powders were 45.19 and 74.69%, respectively.

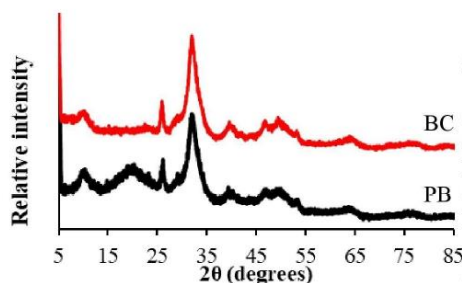


Figure. 1 X-ray diffraction patterns of prepared bone (PB) and bio-calcium (BC) powders from hybrid catfish bones.

3.5 FTIR spectra of powders

The FTIR spectra of the PB and BC powder samples obtained from different processes are shown in Figure 2. The amide I band of the BC powder was detected at $1,636\text{ cm}^{-1}$. de Campos Vidal and Mello [20] found that the absorption peak at $1,633\text{ cm}^{-1}$ was typical for the coiled structure of collagen. The absorption band of amide II bands, $1,550\text{ cm}^{-1}$, was found in the BC powder, which arose from an out-of-phase combination of a C–N stretch and in-plane NH deformation modes of the peptide group [21]. The peaks corresponding to hydroxyapatite were detected for both samples around $1,046$, 601 , and 568 cm^{-1} . The band at 875 cm^{-1} arose from hydrogenophosphates [13] were also present. The bands related to the bending vibration of phosphate (PO_4^{3-} , O–P) [22] were clearly observed at $1,040$ and $1,046\text{ cm}^{-1}$ for the PB and BC powders, respectively.

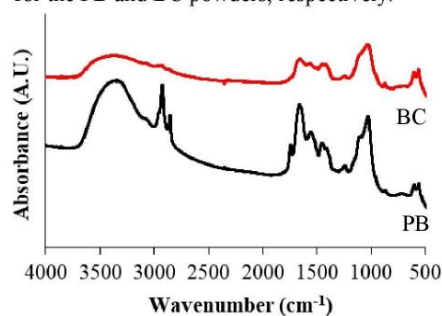


Figure. 2 FTIR spectra of prepared bone (PB) and bio-calcium (BC) powders from hybrid catfish bones.

3.6 Lipid Oxidation

Lipid oxidation products of hybrid catfish bones with different treatments expressed as TBARS values are shown in Figure 3. PB had the highest TBARS value ($2.66\text{ mg MDA/kg sample}$). TBARS value has been used to measure the decomposition of hydroperoxides into the secondary oxidation products, especially aldehydes which can develop to fishy odor [23]. TBARS of bones decreased when high pressure water jet and alkaline treatment were used ($p < 0.05$). Nevertheless, the decrease in TBARS was observed when ethanol was used for defatting. This was shown by the lower TBARS in PL sample. Further bleaching with H_2O_2 can reduce the TBARS values of bones.

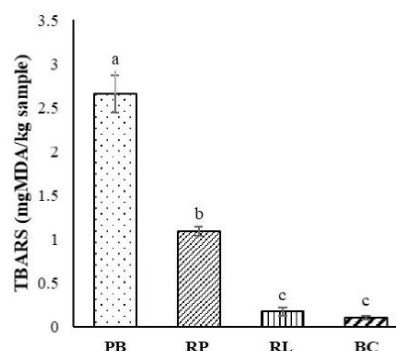


Figure 3. TBARS values of hybrid catfish bone with different treatments. Values are expressed as mean \pm SD ($n=3$).

4. Conclusion

Hybrid catfish bone can be used as a raw material for production bio-calcium. Cleaning with water jet and defatting with ethanol had affected on the removal of lipid oxidation products and fishy odor. Bleaching using H_2O_2 can improve the whiteness of bio-calcium. Thus, the combined treatments were recommended for production of bio-calcium.



Acknowledgement

Authors gratefully acknowledge financial support from Research and Researchers for Industries project (RRI) - Thailand research Fund (TRF) and Life Farm Land Company

Limited. In addition, we wish to thank Maejo University for conference funding.

References

- [1] Vallet-Regi, M., and González-Calbet, J. M. (2004). Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in Solid State Chemistry*, vol. 32(1-2), pp. 1-31.
- [2] Sunyecz, J. A. (2008). The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis, *Therapeutics and Clinical Risk Management*, vol. 4(4), pp. 827-836.
- [3] Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., De Carlos, A., and León, B. (2012). Biological hydroxyapatite obtained from fish bones, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 32(3), pp. 478-486.
- [4] Roland, D. A. (1986). Eggshell quality IV: oystershell versus limestone and the importance of particle size or solubility of calcium source, *World's Poultry Science Journal*, vol. 42(2), pp. 166-171.
- [5] Mengumphan, K., and Panase, P. (2015). Morphometric and meristic divergence of two hybrid catfish: backcross (F1 hybrid female× *Pangasianodon gigas* Chevey 1931 male) and reciprocal backcross (*P. gigas*, female× F1 hybrid male), *Asian Fisheries Science*, vol. 28, pp. 37-46.
- [6] Peanase, P., and Mengumphan, K. (2015). Growth performance length-weight relationship and condition factor of backcross and reciprocal hybrid catfish Reared in Ned cages, *International Journal of Zoological Research*, vol. 11, pp. 57-64.
- [7] Sutthi, N., Amornlerdpisan, D., Chitmanat, C., and Mengumphan, K. (2014). Annual growth and reproductive performance in an F2 catfish hybrid, *Journal of Advanced Agricultural Technologies Vol.*, vol. 1(2), pp. 113-118.
- [8] Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., and Tanaka, M. (2005) Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayemus*), *Food Chemistry*, vol. 89(3), pp. 363-372.
- [9] Toppe, J., Albrektsen, S., Hope, B., and Aksnes, A. (2007). Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 146(3), pp. 395-401.
- [10] Hamada, M., Nagai, T., Kai, N., Tanoue, Y., Mae, H., Hashimoto, M., Miyoshi, K., Kumagai, H., and Saeki, K. (1995). Inorganic constituents of bone of fish, *Fisheries Science*, vol. 61(3), pp. 517-520.
- [11] Witten, P., Huysseune, A., and Hall, B. (2010). A practical approach for the identification of the many cartilaginous tissues in teleost fish, *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 26(2), pp. 257-262.
- [12] Benjakul, S., Oungbho, K., Visessanguan, W., Thiansilakul, Y., and Roytrakul, S. (2009). Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayemus* and *Priacanthus macracanthus*, *Food Chemistry*, vol. 116(2), pp. 445-451.
- [13] Benjakul, S., Mad-Ali, S., Senphan, T., and Sookchoo, P. (2017). Biocalcium powder from precooked skipjack tuna bone: Production and its characteristics, *Journal of Food Biochemistry*, vol. 41(6), pp. e12412.
- [14] Benjakul, S., Mad-Ali, S., Senphan, T., and Sookchoo, P. (2018). Characteristics of biocalcium from



- pre-cooked skipjack tuna bone as affected by different treatments, *Waste and Biomass Valorization*, vol. 9(8), pp. 1369-1377.
- [15] AOAC. (2000) Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC.
- [16] Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation, In *Methods in Enzymology*, pp 302-310, Elsevier.
- [17] Wulandari, P., and Kusumasari, S. (2019). Effect of extraction methods on the nutritional characteristics of milkfish (*Chanos chanos Forsskal*) bone powder, In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Doi:10.1088/1755-1315/383/1/012035 .
- [18] Kim, S. K., Park, P. J., Byun, H. G., Je, J. Y., Moon, S. H., and Kim, S. H. (2003). Recovery of fish bone from hoki (*Johnius belengeri*) frame using a proteolytic enzyme isolated from mackerel intestine, *Journal of Food Biochemistry*, vol. 27(3), pp. 255-266.
- [19] Jung, W.-K., Park, P.-J., Byun, H.-G., Moon, S.-H., and Kim, S.-K. (2005) Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase, *Food Chemistry*, vol. 91(2), pp. 333-340.
- [20] de Campos Vidal, B., and Mello, M. L. S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy, *Micron*, vol. 42(3), pp. 283-289.
- [21] Gashti, M. P., Stir, M., and Hulliger, J. (2016). Growth of strontium hydrogen phosphate/gelatin composites: a biomimetic approach, *New Journal of Chemistry*, vol. 40(6), pp. 5495-5500.
- [22] Chakraborty, R., and RoyChowdhury, D. (2013) Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification, *Chemical Engineering Journal*, vol. 215, pp. 491-499.
- [23] Thiansilakul, Y., Benjakul, S., and Richards, M. P. (2011). Effect of myoglobin from Eastern little tuna muscle on lipid oxidation of washed Asian seabass mince at different pH conditions, *Journal of Food Science*, vol. 76(2), pp. C242-C249.

ได้รับการตีพิมพ์บทความวิจัยลงวารสารวิทยาศาสตร์บูรพา มหาวิทยาลัยบูรพา ในหัวข้อเรื่อง
 “การพัฒนากระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาหนังลูกผสม” ปีที่ 26 (ฉบับที่ 3)
 กันยายน - ธันวาคม พ.ศ. 2564

ที่ ววบ/๒๕๖๔-๐๔๐



คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
 ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี ๒๐๑๓๑

๕ กุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๖๔

เรื่อง แจ้งตอบรับบทความเพื่อออกเผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์บูรพา
 เรียน คุณเจนจิรา นิเวศน์, คุณเกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, คุณวิจิตรา แดงปรก, คุณกิตติมา สีละพงศ์วัฒนา,
 คุณสุรสาธินี ญาณภักดิ์ และ คุณธีระพล เสนพันธ์ุ

ตามที่ท่านได้ส่งบทความวิจัยเพื่อเข้ารับการพิจารณาออกนิตยสารคุณภาพบทความในวารสาร
 วิทยาศาสตร์บูรพา บัดนี้ ขั้นตอนได้ดำเนินการเสร็จสิ้นเรียบร้อยแล้ว จึงขอแจ้งผลการตอบรับบทความ ดังนี้
บทความ ID : 3769

ชื่อเรื่องภาษาไทย : การพัฒนากระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาหนังลูกผสม

ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษ : Process Development of Biocalcium from Hybrid Catfish
 (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*)
 Bone

ฉบับที่ออกเผยแพร่ : วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ ๒๖ (ฉบับที่ ๓)

กันยายน - ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๖๔

และในโอกาสนี้กองบรรณาธิการวารสาร ฯ ขอขอบคุณที่ท่านได้ให้ความไว้วางใจในการส่งบทความเพื่อเข้ารับ
 การพิจารณา และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าท่านจะให้ความสนใจส่งบทความในโอกาสต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิภูษิต มั่นทะจิตร์)
 บรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์บูรพา

งานวารสารวิทยาศาสตร์บูรพา

โทรศัพท์ ๐๓๘-๑๐๓๐๓๔

อีเมล buscij@buu.ac.th

เว็บไซต์ <http://science.buu.ac.th/part/buscij/>

ภาพปกคณวทที่ 9 หนังสือตอบรับการตีพิมพ์บทความในวารสารวิทยาศาสตร์บูรพา
 มหาวิทยาลัยบูรพา

การพัฒนากระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาหนังลูกผสม
 Process Development of Bioactive Calcium from Hybrid Catfish
 (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) Bone

เจนจิรา นิเวศน์¹, เกียรติศักดิ์ เม่งอำพัน², วิจิตรา แดงปรก¹, กิตติมา ลีละพงศ์วัฒนา³, สุธาสิณี ญาณภักดิ์⁴
 และ ชีระพล เสนพันธ์^{1*}

Jenjira Niwet¹, Kriangsak Mangumphan², Wichittra Daengprok¹, Kittima Leelapongwattana³,
 Suthasinee Yarnpakdee and Theeraphol Senphan^{1*}

¹ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

¹Program in Food Science and Technology, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University

² สาขาเทคโนโลยีประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University

³ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

Division of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Technology, Phetchaburi Rajabhat University

⁴ สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ทางทะเล คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Division of Marine Product Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University

บทคัดย่อ

ไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาเป็นผลิตภัณฑ์แคลเซียมชนิดอินทรีย์ที่มีคุณภาพสูง วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อพัฒนาระบบวิธีการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาหนังลูกผสม (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) 4 ขั้นตอน ประกอบด้วย 1) กระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูง 2) กระบวนการแช่ในสารละลายต่าง 3) กระบวนการแช่ในตัวทำละลายเอทานอล 4) กระบวนการฟอกสีและบดให้เป็นผงไบโอแคลเซียม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ ร้อยละผลผลิต องค์ประกอบทางเคมี ค่าสี การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และโครงสร้างทางจุลภาคของกระดูกปลาจาก 4 กระบวนการ พบว่า ไบโอแคลเซียมที่ได้มีร้อยละผลผลิตของเท่ากับ 14.46 % นอกจากนี้ ไบโอแคลเซียมมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และความชื้นลดลง แต่กลับมีปริมาณเถ้า และค่าความสว่าง (L*) เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามกระบวนการแช่ในสารละลายเอทานอลและฟอกสี แล้วบดให้เป็นผงไบโอแคลเซียมจะทำให้มีค่า Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) ลดลงอย่างมาก ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการก่อนหน้า และผงไบโอแคลเซียมที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็กขนาด 2-10 ไมโครเมตร กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นกระบวนการข้างต้นมีความเหมาะสมที่จะทำได้มาซึ่งไบโอแคลเซียมที่มีคุณภาพดี เป็นผงละเอียด มีสีขาวบริสุทธิ์ ปราศจากกลิ่นคาวและกลิ่นเหม็นหืนสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมแคลเซียมได้

คำสำคัญ : กระดูกปลา ; กระบวนการ ; ไบโอแคลเซียม ; ปลาหนังลูกผสม

Abstract

Biocalcium from fish bones is a high quality of organic calcium product. The objective of this research was to develop a process for biocalcium production from hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* x *Pangasianodon hypophthalmus*) bones including 4 steps: 1) high pressure water jet process 2) soaking in alkaline solution 3) ethanol immersion process 4) bleaching and grinding to obtain biocalcium powder. %Yield, chemical composition, color values, lipid oxidation and the microstructure of all processes of fish bone were analyzed. It found that obtained biocalcium had %yield of 14.46%. In addition, bio-calcium had a low protein, fat and moisture contents but increasing in ash content and the lightness values (L^*) were observed ($p \leq 0.05$). However, the process of ethanol immersion, bleaching and grinding to obtain biocalcium powder decreased in Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) values ($p \leq 0.05$) compared to the previous process. The particle sizes of biocalcium powder were in a range of 2-10 μm and distributed uniformly. Therefore, biocalcium production was suitable process to obtain a good quality biocalcium of fine powder, white color, without fishy and rancid odor. It can be developed as a calcium supplement.

Keywords : Biocalcium ; Process ; Fish bone ; Hybrid catfish

*Corresponding author. E-mail : theeraphol_s@mju.ac.th

บทนำ

ปลาหนังลูกผสม (*Pangasianodon gigas* x *Pangasianodon hypophthalmus*) เป็นปลาที่มีการพัฒนาสายพันธุ์มาจากปลาบึก โดยนำปลาบึกสายพันธุ์แท้มาผสมกับปลาสวาย และคัดเลือกลักษณะพันธุ์หลาย ๆ รุ่นตามลำดับ จนได้เป็นปลาหนังลูกผสม ซึ่งเป็นที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว คุณภาพเนื้อดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และทนต่อโรค ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงปลาหนังลูกผสมเพื่อจำหน่ายทางการค้าเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อปลาแช่แข็งและผลิตภัณฑ์แปรรูปต่าง ๆ เพื่อจำหน่ายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ สร้างรายได้อย่างมหาศาลให้กับกลุ่มเกษตรกรเพาะเลี้ยง และผู้ประกอบการ (Panase & Mengumphan, 2015) อย่างไรก็ตามหลังจากกระบวนการแปรรูปปลาหนังลูกผสมจะเกิดวัสดุเศษเหลือ คือ โครงกระดูกปลา มากถึงร้อยละ 40 ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ส่วนใหญ่ไม่ได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากย่อยสลายยาก และมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ ทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมรวมถึงมีค่าใช้จ่ายในการกำจัดที่สูงจึงนิยมนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ซึ่งมีราคาถูก (Luu & Nguyen, 2009) มีรายงานว่ากระดูกปลาหนังลูกผสมมีคุณค่าทางโภชนาการที่อุดมไปด้วยโปรตีน และแร่ธาตุที่สำคัญ คือ แคลเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น (Logesh *et al.*, 2012) นอกจากนี้ผลึกแคลเซียมในกระดูกปลาส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ซึ่งเป็นผลึกแคลเซียมรูปแบบเดียวกับที่พบในกระดูกมนุษย์ (Shi *et al.*, 2018) ส่วนแคลเซียมจากเปลือกไข่และเปลือกหอยจะอยู่ในรูปแคลเซียมคาร์บอเนต (Murakami *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามแคลเซียมจากแหล่งธรรมชาติเหล่านี้มีราคาถูกกว่ากลุ่มแคลเซียมคิเลต และแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งสามารถละลายน้ำ และดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดี (Cross *et al.*, 2005) นอกจากกระดูกปลาจะเป็นวัสดุเศษเหลือที่มีแร่ธาตุแคลเซียม และฟอสฟอรัสสูงแล้ว ยังพบว่ามีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ คอลลาเจน และ คอนดรอยตินอีกด้วย ซึ่งคอลลาเจนจะมีกรดอะมิโนและอนุพันธุ์ของกรดอะมิโน คือ โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน ตามลำดับเป็นองค์ประกอบที่สามารถดูดซึมร่วมกับแคลเซียมผ่านทางลำไส้เล็กของหนูทดลองได้ดี (Vázquez *et al.*, 2013)

ไบโอแคลเซียม (Bio calcium) คือ สารประกอบอินทรีย์แคลเซียมที่มีสารประกอบอินทรีย์หลงเหลืออยู่เนื่องจากผ่านกระบวนการแปรรูปไม่รุนแรงซึ่งใช้ความร้อนในระดับที่ต่ำทำให้ไบโอแคลเซียมที่ได้อุดมไปด้วยคอลลาเจนและเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ทำให้แคลเซียมถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายที่ลำไส้เล็กได้ดีกว่าผลิตภัณฑ์อาหารเสริมแคลเซียมที่ใช้ความร้อนสูงจากการเผาเพื่อให้เหลือแต่สารประกอบอินทรีย์อย่างเดียว (Benjakul *et al.*, 2017) มีรายงานว่า Benjakul และคณะ (2017) ศึกษากระบวนการผลิตและคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบ (Skipjack tuna) ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลาทูน่ากระป๋อง โดยนำกระดูกปลาทูน่าดังกล่าวมาผ่านกระบวนการฉีบน้ำด้วยเครื่องฉีบน้ำแรงดันสูงเพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน จากนั้นกำจัดไขมันด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ตามด้วยฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และลดขนาดด้วยการบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดแบบลูกบอล (ball mill) ตามลำดับ ได้เป็นไบโอแคลเซียม จากนั้นเปรียบเทียบคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมกับแคลเซียมจากกระดูกปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบที่ผ่านกระบวนการเผาที่อุณหภูมิ 1,100 องศาเซลเซียสพบว่าแคลเซียมจากการเผามีปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสมากกว่าไบโอแคลเซียม แต่ไบโอแคลเซียมมีสมบัติการละลาย ฤทธิ์ทางชีวภาพ และความสามารถในการดูดซึมแคลเซียมในระบบจำลองการย่อยอาหารของร่างกายสูงกว่า

แคลเซียมที่ได้จากการเผา ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาแห้งลูกผสมซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีมูลค่าสูง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมโครงกระดูกปลา

นำกระดูกแกน (axial skeleton) ของปลาแห้งลูกผสมหลังจากกระบวนการผลิตเนื้อปลาแช่แข็งแช่เยือกแข็งของบริษัท ไลฟ์ ฟาร์มแลนด์ จำกัด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ มาล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก และเศษเนื้อที่ติดค้างอยู่ จะได้กระดูกที่สะอาด ก่อนเก็บในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีนแล้วนำไปบรรจุใส่ถังโม่ที่เติมน้ำแข็งในอัตราส่วนโครงกระดูกต่อน้ำแข็ง 1:2 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้น้อยกว่า 4 องศาเซลเซียส ก่อนขนส่งมายังโรงงานนาร่องของสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเก็บรักษาไว้ในตู้แช่เยือกแข็ง (SF-PC997, Panasonic, Thailand) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ไม่เกิน 2 เดือน) เพื่อนำมาศึกษากรรมวิธีการผลิตและคุณลักษณะของไบโอแคลเซียมต่อไป

2. การผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาแห้งลูกผสม

ผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาแห้งลูกผสมโดยดัดแปลงวิธีการเตรียมตัวอย่างจาก Benjakul *et al.* (2017) นำตัวอย่างกระดูกปลาแห้งลูกผสมแช่เยือกแข็งมาทำละลาย โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (24-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ก่อนใช้เครื่องฉีดย้ำแรงดันสูง (Warrior101, Polo, China) มาฉีดย้ำแรงดันสูงเพื่อกำจัดเศษเนื้อปลาที่ติดอยู่กับโครงกระดูกและล้างทำความสะอาด จะได้กระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการฉีดย้ำ (1) จากนั้นนำกระดูกปลาแห้งลูกผสมไปต้มกับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอัตราส่วนกระดูกต่อสารละลาย 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดหลายครั้งจนกระทั่งตัวอย่างมีค่าพีเอชเป็นกลาง (pH 7.0 – 7.5) จากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน (FD56, Binder, China) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ความชื้น $4 \pm 1\%$) และลดขนาดให้ได้ขนาดอนุภาคประมาณ 2-4 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องบดของแห้ง (FDM303SS, Kenwood, Thailand) จะได้กระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการล้างน้ำต่าง (2) จากนั้นนำกระดูกปลาที่ผ่านการบดแช่ในเอทานอล 95% ในอัตราส่วนกระดูกต่อตัวทำลายเอทานอล 1: 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) กวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนสารแบบใบกวน (OS20-S, Overhead Stirrer, China) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อทิ้งตัวทำลายเอทานอล ก่อนแยกเอากระดูก โดยกระดูกที่ผ่านการกรองตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) จนกว่ากลิ่นสารละลายจะหมดไปใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จะได้กระดูกปลาที่ผ่านการแช่ตัวทำลายเอทานอล (3) จากนั้นนำกระดูกปลาแห้งมาแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอัตราส่วนกระดูกต่อสารละลาย 1:2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) กวนอย่างต่อเนื่องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างทำความสะอาดด้วยน้ำก่อนนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ความชื้น $4 \pm 1\%$) และบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดพินนิล (Retsch ZM1000, Centrifugal Grinding Mill,

Singapore) จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh จะได้เป็นผงไบโอแคลเซียม (4) เก็บไว้ในถุงอะลูมิเนียมฟรอยด์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวิเคราะห์

3. วิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (% yield)

การคำนวณหาค่าร้อยละผลผลิต (%Yield) ของกระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการต่างๆ โดยการเปรียบเทียบ น้ำหนักกระดูกปลาหลังผ่านกระบวนการต่างๆ กับน้ำหนักกระดูกปลาเริ่มต้นดังสมการ

$$\text{ร้อยละผลผลิต (\% yield)} = \frac{\text{น้ำหนักกระดูกปลาหลังผ่านกระบวนการต่างๆ}}{\text{น้ำหนักกระดูกปลาเริ่มต้น}} \times 100$$

4. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis)

เตรียมกระดูกปลาหนึ่งลูกผสมจากกระบวนการการแปรรูปต่างๆ ทั้ง 4 กระบวนการข้างต้น จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยวิเคราะห์หาค่าปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมัน ตามวิธี AOAC วิธีการที่ 927.05, 942.05, 920.38B และ 984.13 ตามลำดับ (AOAC, 2000)

วิเคราะห์ธาตุแคลเซียมในตัวอย่างผงไบโอแคลเซียมด้วยเครื่อง inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES) (Model Optima 4300 DV, Perlin Elmer, Shelton, MA)

5. วิเคราะห์ค่าสี

วิเคราะห์ค่าสีของกระดูกปลาหนึ่งลูกผสมจากกระบวนการการแปรรูปต่างๆ ทั้ง 4 กระบวนการข้างต้นด้วยเครื่องวัดค่าสี (ColorFlex EZ, Hunter Lab) ในระบบ CIE โดยวิเคราะห์ค่า L^* value (ค่าความสว่าง), a^* value (สีแดง/เขียว), b^* value (สีเหลือง/สีน้ำเงิน) และวิเคราะห์ความต่างของสี ΔE^*

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

โดยที่ ΔL^* , Δa^* และ Δb^* คือ ความต่างระหว่างพารามิเตอร์สีของตัวอย่าง และพารามิเตอร์สีของสแตนดาร์ดสีขาว ($L^* = 93.59$, $a^* = -0.98$ และ $b^* = 0.35$) ซึ่งใช้เป็นแผ่น Background

6. วิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

วิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในกระดูกปลาหนึ่งลูกผสมจากกระบวนการการแปรรูปต่างๆ ทั้ง 4 กระบวนการ ด้วยวิธี Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) (Buege & Aust, 1978) โดยนำตัวอย่างกระดูกปลาบดละเอียด 1 กรัม ผสมกับสารละลายที่มี 0.375% thiobarbituric acid (w/v), 15% trichloroacetic acid (w/v) และ 0.25 M HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจิไนซ์ด้วยเครื่องโฮโมจิไนซ์เซอร์ (T25, Ultra-turrax, Burlin, Germany) ที่ความเร็ว 15000 rpm นาน 1 นาที และปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท ก่อนนำไปให้ตั้งในน้ำเดือด (100 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นด้วยการแช่หลอดทดลองในน้ำประปา และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (RC 5C plus, Sorvall, NY., USA.) ความเร็ว 5,600×g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกส่วนที่ละลายได้ (supernatant) ออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสง วัดที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (VIS-723G, Rayleigh, Beijing, China) เทียบกับกราฟมาตรฐานของ 1,1,3,3-

tetramethoxypropane (MDA) ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 6 ppm แสดงผลการทดลองในหน่วยมิลลิกรัม malonaldehyde ต่อกรัมตัวอย่าง

7. วิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาค

วิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคโดยตรวจวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของกระดูกปลาแห้งลูกผสมที่ผ่านการฉีดน้ำด้วยเครื่องฉีดน้ำแรงดันสูง (1) และผงไปโอแคลเซียม (4) โดยเตรียมตัวอย่างติดที่ขั้วบรอนซ์และเคลือบด้วยทองคำ (Sputter coater SPI-Module, West Chester, PA, USA) ก่อนส่องผ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) (JSM-5410LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) ด้วยแรงดันไฟฟ้าแรง 15 kV และใช้กำลังขยาย 1,500 เท่า

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

1. ร้อยละผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมี

กระดูกปลาแห้งลูกผสมที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตปลาแห้งเนื้อแช่เยือกแข็ง เมื่อนำมาผ่านกระบวนการต่อเนื่องทั้ง 4 ขั้นตอน (ภาพที่ 1) ได้เป็นไปโอแคลเซียม ซึ่งมีปริมาณร้อยละผลผลิตสูงถึง 14.46 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาร้อยละขององค์ประกอบทางเคมี แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าค่าปริมาณร้อยละความชื้น โปรตีนและไขมัน ของกระดูกปลาแห้งเนื้อแช่เยือกแข็งอย่างต่อเนื่อง เมื่อผ่านขั้นตอนการแปรรูปต่างๆ โดยเริ่มจากกระดูกปลาแห้งที่ผ่านกระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูงตามด้วยการแช่น้ำต่าง จากนั้นนำมาผ่านการแช่ตัวทำละลายเอทานอล ก่อนนำกระดูกปลาไปผ่านการฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และบดให้เป็นผงละเอียดจนได้เป็นไปโอแคลเซียมตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณเถ้าของตัวอย่างกระดูกปลาแห้งเนื้อแช่เยือกแข็งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากเริ่มต้นจนถึงกระบวนการสุดท้ายที่ได้เป็นผงไปโอแคลเซียมซึ่งพบว่ามีปริมาณเถ้าสูงถึง 68.15 % และพบปริมาณแร่ธาตุแคลเซียม 24.84 ± 0.39 %



ฉีดน้ำแรงดันสูง (1)

แช่น้ำต่าง (2)

แช่ตัวทำละลาย (3)

ไปโอแคลเซียม (4)

ภาพที่ 1 กระดูกปลาแห้งลูกผสมที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมีของกระดุกปลาแห้งลูกผสมในระหว่างกระบวนการไปโอแคลเซียม

กระบวนการ	ร้อยละผลผลิต (% yield)	องค์ประกอบทางเคมี (%wt)			
		ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ฉีดย้ำแรงดันสูง	23.58 ± 5.06 ^{a**}	4.70 ± 0.46 ^a	10.46 ± 0.96 ^a	2.46 ± 0.07 ^a	46.77 ± 2.86 ^c
แช่ในน้ำต่าง	17.25 ± 3.21 ^{ab}	3.33 ± 0.80 ^b	7.26 ± 0.10 ^b	1.93 ± 0.09 ^b	59.54 ± 3.71 ^b
แช่ตัวทำละลาย	15.29 ± 2.43 ^b	3.11 ± 0.43 ^b	6.17 ± 0.18 ^c	0.13 ± 0.03 ^c	63.99 ± 2.90 ^{ab}
ไปโอแคลเซียม	14.46 ± 2.66 ^b	1.42 ± 0.45 ^c	2.86 ± 0.13 ^d	0.07 ± 0.03 ^d	68.15 ± 3.60 ^a

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 2 ค่าสีของกระดุกปลาแห้งลูกผสมในระหว่างกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ไปโอแคลเซียม

กระบวนการ	L*	a*	b*	ΔE^*
ฉีดย้ำแรงดันสูง	43.04 ± 0.07 ^{c**}	-1.09 ± 0.02 ^a	11.98 ± 0.02 ^a	7.02 ± 0.05 ^c
แช่ในน้ำต่าง	46.56 ± 0.72 ^b	-1.10 ± 0.05 ^a	9.00 ± 0.33 ^b	10.35 ± 0.67 ^b
แช่ตัวทำละลาย	48.57 ± 0.12 ^a	-1.25 ± 0.02 ^b	5.77 ± 0.07 ^c	12.83 ± 0.11 ^a
ไปโอแคลเซียม	48.68 ± 0.23 ^a	-1.45 ± 0.00 ^c	5.89 ± 0.04 ^c	12.92 ± 0.20 ^a

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

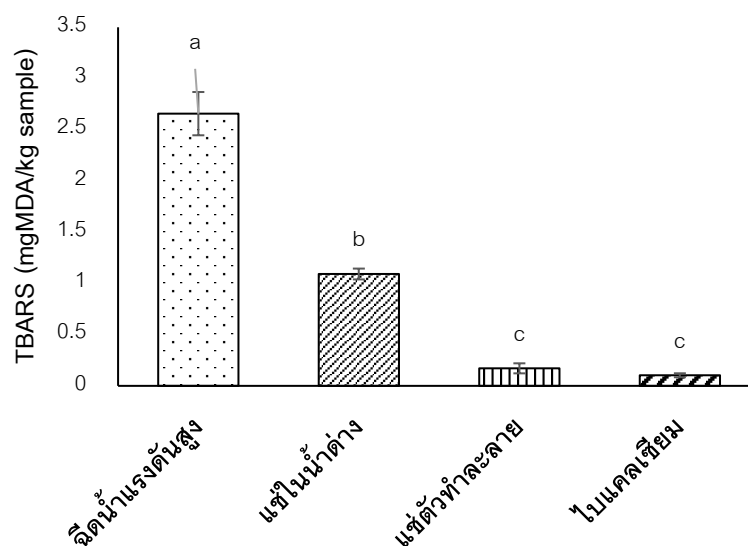
** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวสทมภ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

2. ค่าสี

ค่าสีของตัวอย่างกระดุกปลาเมื่อผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2 พบว่า ตัวอย่างกระดุกปลาเมื่อผ่านกระบวนการฉีดย้ำแรงดันสูงเริ่มต้นจนกระทั่งถึงกระบวนการสุดท้ายได้เป็นไปโอแคลเซียมมีค่าความสว่าง (L*) และ ค่าความต่างสี (ΔE^*) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และมีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามตัวอย่างกระดุกปลาเมื่อผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ มีผลทำให้ค่าความเป็นสีเหลือง (b*) ลดลง และมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3. การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

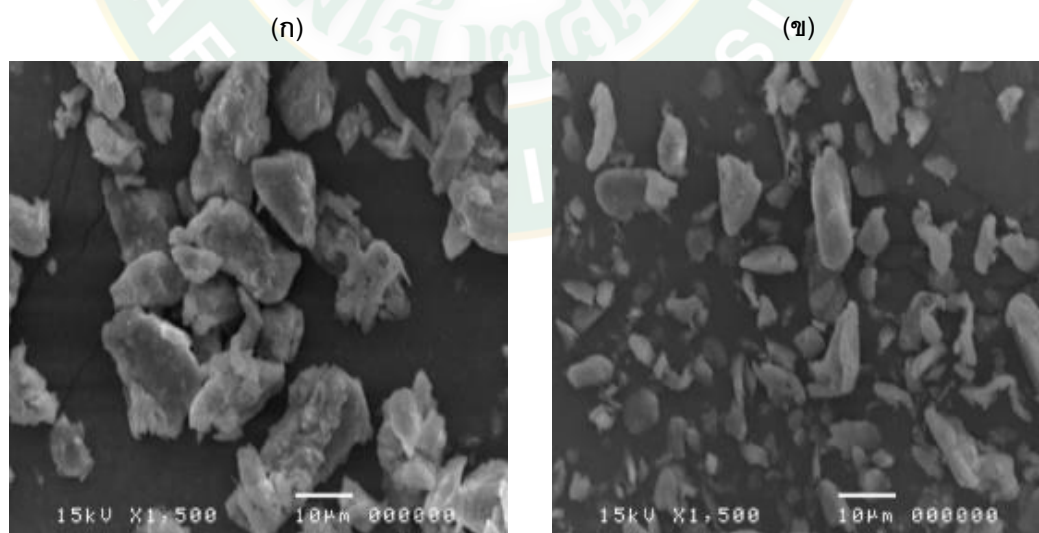
ค่าการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (TBARS) ของตัวอย่างกระดุกปลาเมื่อผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 2 พบว่า ค่า TBARS มีแนวโน้มลดลง จากขั้นตอนการล้างกระดุกปลาแห้งด้วยเครื่องฉีดย้ำแรงดันสูง จนถึงขั้นตอนสุดท้ายที่ได้ไปโอแคลเซียมโดยลดลงจาก 2.66 ถึง 0.1 mg MDA/kg sample ตามลำดับ



ภาพที่ 2 การเกิดออกซิเดชันของผงไปโอแคลเซียมโดยวิธี TBARS ของกระดูกปลาหนังลูกผสมที่ผ่านกระบวนการผลิต

4. โครงสร้างทางจุลภาค

โครงสร้างทางจุลภาคของตัวอย่างกระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการผลิตขั้นตอนการฉีดน้ำด้วยเครื่องฉีดน้ำแรงดันสูง และผงไปโอแคลเซียมแสดงดังภาพที่ 3 พบว่ากระดูกปลาที่ผ่านกระบวนการฉีดน้ำด้วยเครื่องฉีดน้ำแรงดันสูง มีขนาดใหญ่และมีการเกาะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ จนถึงขั้นตอนสุดท้ายจะได้เป็นผงไปโอแคลเซียมที่มีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็กขนาด 2-10 ไมโครเมตร กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางจุลภาคของกระดูกปลาหนังลูกผสมที่ผ่านกระบวนการฉีดน้ำแรงดันสูง (ก) และผงไปโอแคลเซียม (ข)

วิจารณ์ผลการวิจัย

กระดุกปลาแห้งลูกผสมบิกสยามแม่โจ้เป็นวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาแห้งแล่นเนื้อแช่เยือกแข็ง ก่อนนำมาผ่านกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ ได้เป็นไปโอแคลเซียม พบว่ากระดุกปลาสดที่ฉีดล้างด้วยเครื่องฉีดน้ำแรงดันสูง มีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 23.58 ± 5.06 จนกระบวนการสุดท้ายได้เป็นผงไปโอแคลเซียมซึ่งมีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 14.46 ± 2.66 เนื่องจากส่วนประกอบของสารอินทรีย์ที่ติดอยู่กับกระดุกปลาแห้งลูกผสม ได้แก่ เศษเนื้อ น้ำเลือด ไขมัน และไขกระดูก ถูกกำจัดออกไปจากกระดุกสด ทั้งการถูกฉีดเศษเนื้อ เลือด ออกด้วยเครื่องฉีดน้ำแรงดันสูง การแช่ในสารละลายต่างที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพและละลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อปลาออกไป และแช่ในตัวทำละลายเอทานอลที่จะละลายไขมันออกจากกระดุกปลา อีกทั้งกระดุกแกนกลางของปลาแห้งลูกผสมมีขนาดค่อนข้างใหญ่ เมื่อผ่านกระบวนการต่าง ๆ ทำให้เกิดการสูญเสียกระดูกได้แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตนี้ยังได้ผงไปโอแคลเซียมที่มีร้อยละผลผลิตที่สูง ซึ่งไปโอแคลเซียมมีแร่ธาตุเป็นส่วนมากที่เป็นสารประกอบอนินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ เช่น แคลเซียมและฟอสฟอรัส ซึ่งผงไปโอแคลเซียมจากกระดุกปลาแห้งลูกผสมนี้มีปริมาณแร่ธาตุแคลเซียมเท่ากับ 24.84 ± 0.39 % มีรายงานการผลิตผงแคลเซียมจากกระดุกปลาโม่ที่เป็นปลาแห้งน้ำจืดเช่นเดียวกัน มีร้อยละผลผลิตผงแคลเซียมอยู่ที่ 10.37 ลักษณะผงแคลเซียมมีสีครีม จับตัวกันเป็นก้อน ไม่กระจายตัว และมีกลิ่นของคาวปลา (Suwansakornkul & Jongrattiporn, 2012) ซึ่งต่างจากไปโอแคลเซียมที่ผลิตได้ที่มีสีขาวนวล เป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นคาว

ในระหว่างกระบวนการผลิตไปโอแคลเซียมจากกระดุกปลาแห้งลูกผสมบิกสยามแม่โจ้ จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของกระดุกปลา (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้กระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ การฉีดน้ำแรงดันสูง การล้างน้ำต่าง การแช่ในตัวทำละลายเอทานอล และการแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนบดให้เป็นผง เป็นต้น พบว่าค่าปริมาณความชื้นของกระดุกปลาแห้งลูกผสมอยู่ในช่วง 1.4 – 4.7 % มีแนวโน้มลดลงเมื่อผ่านกระบวนการต่าง ๆ ซึ่งค่าปริมาณความชื้นนี้อยู่ในเกณฑ์อาหารแห้ง ทำให้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนและไขมัน มีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาเวลาการผลิตด้วยเช่นกัน ดังนั้นการใช้สารละลายต่าง (โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์) มีความสามารถในการละลายเศษเนื้อที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบให้หลุดออกจากกระดุกปลาทำให้ได้โครงกระดูกที่บริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Idowu และคณะ (2020) ที่ศึกษากระบวนการผลิตไปโอแคลเซียมและไฮดรอกไซด์อะพาไทต์จากกระดุกปลาแชลมอนด้วยการแช่กระดุกปลาในสารละลายต่าง พบว่าการใช้สารละลายต่างสามารถกำจัดเศษเนื้อที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบออกจากกระดุกปลาแชลมอนได้ แต่ไม่มีผลในการละลายโปรตีนคอลลาเจนออกจากกระดุกปลา อย่างไรก็ตามปริมาณเถ้าบ่งบอกได้ถึงปริมาณแร่ธาตุและสารประกอบอนินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในกระดุกปลา จะเห็นได้ว่าเมื่อนำกระดุกปลาแห้งลูกผสมมาผ่านกระบวนการแปรรูปขั้นตอนต่าง ๆ พบว่าจะมีปริมาณเถ้าเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากในแต่ละขั้นตอนมีการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ออกไปจึงทำให้ปริมาณสารประกอบอนินทรีย์สูงตามปริมาณเถ้าที่เพิ่มมากขึ้นนั่นเอง นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตไปโอแคลเซียมจากกระดุกปลาทูนาครีบเหลือง พบว่าไปโอแคลเซียมมีปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้นลดลง แต่ปริมาณเถ้าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกระดุกปลาสดเริ่มต้น อย่างไรก็ตามการกำจัดไขมันออกจากกระดุกปลาเพื่อลดปริมาณกลิ่นเหม็นหืนและกลิ่นไม่พึงประสงค์ ในไปโอแคลเซียมนิยมใช้ตัวทำละลาย

อินทรีย์ เช่น เฮกเซน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีสี จึงละลายไขมันออกมาจากกระดูกปลาได้ (Cascont *et al.*, 2017) จากการทดลองใช้เอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งนิยมใช้สกัดสารสำคัญออกจากพืชเนื่องจากเอทานอลจัดเป็นสารกลุ่มที่มีขั้วปานกลางทำให้สามารถสกัดสารที่มีขั้วและสารที่ไม่มีขั้วออกมาได้ มีความสามารถในการละลายสารได้กว้างขวางจึงสามารถชะไขมันออกมาจากกระดูกปลาได้ และมีความปลอดภัยสูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น (Baümler *et al.*, 2016) จึงทำให้กลิ่นคาวปลา กลิ่นเหม็นหืนและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาแห้งถูกผสมลดลงเป็นอย่างมาก

จากขั้นตอนการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดูกปลาแห้งถูกผสมตั้งแต่กระบวนการเริ่มต้นไปจนถึงสุดท้ายได้เป็นไบโอแคลเซียม พบว่าไบโอแคลเซียมที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงของสีที่ดีขึ้น (ตารางที่ 2) เพราะมีค่าความสว่าง (L^*) เพิ่มขึ้น ซึ่งในแต่ละกระบวนการส่งผลให้สีของกระดูกปลามีการเปลี่ยนแปลงไป ในขั้นตอนการแช่ล้างด้วยสารละลายต่าง ขั้นตอนนี้ต่างสามารถกำจัดโปรตีนและสิ่งตกค้างที่เหลืออยู่ โดยต่างจะละลายโปรตีนออกจากกระดูกปลา (Batista, 1999) จึงทำให้กระดูกมีสีที่ขาวขึ้น และขาวเพิ่มขึ้นในขั้นการฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นองค์ประกอบที่ก่อปฏิกิริยาในสารฟอกสีกระดูก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารออกซิไดซ์ซึ่งแพร่กระจายไปทั่วกระดูก และสร้างอนุมูลอิสระ (free radical) ที่ไม่เสถียรออกมาคือไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radicals (HO \cdot)), เพอร์ไฮดรอกซิลเรดิคัล (perhydroxyl radicals (HOO \cdot)), เพอร์ไฮดรอกซิลแอนไอออน (perhydroxyl anions (OO \cdot)) และซูเปอร์ ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anions) โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปมีผลกับโมเลกุลพันธะคู่ของรงควัตถุ (organic pigmented molecules หรือ chromophore molecules) ภายในเนื้อเยื่อของกระดูก พันธะคู่เหล่านี้จะแตกออกเป็นพันธะเดี่ยว จึงส่งผลให้โมเลกุลของรงควัตถุมีขนาดที่เล็กลงทำให้ความสามารถในการดูดซับแสงลดลง เกิดเป็นผลการฟอกสีกระดูก (bleaching effect) ทำให้กระดูกปลาดูขาวและสว่างขึ้น (Spiro & Griffith, 1997) ส่วนขั้นตอนการกำจัดไขมันในกระดูกปลาโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล เนื่องจากไขมันในผลิตภัณฑ์จะส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และการเกิดกลิ่นเหม็นหืนของไบโอแคลเซียม เนื่องจากเกิดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับ จากผลการทดลอง พบว่า การใช้ตัวทำละลายเอทานอลในการสกัดไขมันออกมา ทำให้มีค่าความสว่าง (L^*) สูงขึ้น มีรายงานว่า การใช้เอทานอลกำจัดไขมันในการสกัดโปรตีนไอโซเลตจากปลาเฮลลิ่ง พบว่าโปรตีนไอโซเลตที่ได้มีกลิ่นคาวลดลงอย่างมากจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเนื่องจากมีปริมาณไขมันที่ลดลง (Hoyle & Merritt, 1994) ดังนั้นการผลิตไบโอแคลเซียมที่ผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีนด้วยสารละลายต่าง การกำจัดไขมันด้วยตัวทำละลาย และการฟอกสี ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำให้ได้ไบโอแคลเซียมมีคุณภาพดีขึ้น มีสีที่ขาวขึ้นอีกทั้งยังสามารถลดกลิ่นไม่พึงประสงค์ในไบโอแคลเซียมได้ (Benjakul *et al.*, 2018; Benjakul *et al.*, 2017) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน เป็นสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ในอาหารทุกชนิดที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบรวมไปถึงวัตถุดิบเริ่มต้น หากไม่มีการกำจัดไขมันออกจากอาหารอาจจะทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับจากผู้บริโภค ส่วนค่า TBARS ของกระดูกปลาแห้งถูกผสมที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันขั้นที่สอง (secondary product) ซึ่งจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่ระเหยได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันคือ

สารกลุ่มอัลดีไฮด์ ซึ่งมีกลิ่นหืนและกลิ่นไม่พึงประสงค์ พบว่ากระดุกปลาแห้งลูกผสมที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ มีแนวโน้มการเกิดออกซิเดชันของไขมันลดลง โดยขั้นตอนการกำจัดไขมันออกจากกระดุกปลาด้วยตัวทำละลายเอทานอล จะเห็นได้ว่าค่า TBARS ลดลงอย่างมาก เนื่องจากผลิตภัณฑ์ไม่มีไขมัน หรือสารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งสอดคล้องกับกลิ่นหืนในไบโอแคลเซียมจากปลาห่านำพันธุ์ทองแถบที่ได้ทดสอบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่ได้รับการฝึกฝนซึ่งพบว่ามีกลิ่นหืนลดลง (Benjakul *et al.*, 2017) ในขณะที่โครงสร้างทางจุลภาคตัวอย่างกระดุกปลาแห้งลูกผสมที่ผ่านการฉีดย้ำด้วยเครื่องฉีดย้ำแรงดันสูง (ภาพที่ 3) พบว่า มีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มก้อน เนื่องจากมีโปรตีน และไขมันรวมอยู่ด้วยจึงมีหลายโครงสร้างเกาะรวมกันเป็นกลุ่มก้อน เมื่อผ่านกระบวนการได้เป็นไบโอแคลเซียมพบว่า มีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็กกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ เพราะผ่านการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและไขมันออก ทำให้เหลือเพียงสารประกอบอนินทรีย์ มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดเล็ก อีกทั้งโครงสร้างทางเคมีของไฮดรอกซีอะพาไทต์สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนและหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลที่มีภายในโครงสร้างไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Benjakul *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2018)

สรุปผลการวิจัย

กระดุกปลาแห้งลูกผสมเมื่อนำมาผ่านกระบวนการผลิตต่างๆ จะทำให้ได้ไบโอแคลเซียมที่มีคุณภาพที่ดีขึ้น มีสีขาวบริสุทธิ์ขึ้น ปราศจากกลิ่นคาว และเป็นผงละเอียด ดังนั้นการผลิตไบโอแคลเซียมจากกระดุกปลาแห้งลูกผสม ไม่เพียงแต่เป็นการลดของเสียจากอุตสาหกรรม แต่ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับกระดุกปลาได้สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมไบโอแคลเซียมมูลค่าสูงจากธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการผลิตที่ไม่รุนแรง และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคในอนาคตต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณแหล่งทุนให้การสนับสนุนงานวิจัย คือ โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) 2/2561 รหัสโครงการ 6122049 สัญญาเลขที่ MSD6210062 และทุนกัญญ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีการศึกษา 2561 และขอขอบคุณสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- AOAC, 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC.
- Batista, I., 1999. Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. *European Food Research and Technology*, 210(2), 84-89.
- Bäumler, E. R., M. E. Carrin & A. A. Carelli, 2016. Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 178, 190-197.

- Benjakul, S., S. Mad-Ali, T. Senphan & P. Sookchoo, 2017. Biocalcium powder from precooked skipjack tuna bone: Production and its characteristics. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6), 1-8.
- Benjakul, S., S. Mad-Ali, T. Senphan & P. Sookchoo, 2018. Characteristics of biocalcium from pre-cooked skipjack tuna bone as affected by different treatments. *Waste and Biomass Valorization*, 9(8), 1369-1377.
- Buege, J. A. & S. D. Aust, 1978. Microsomal lipid peroxidation Methods in enzymology. Elsevier, 52, 302-310.
- Cascant, M. M., C. Breil, S. Garrigues, M. de la Guardia, A. S. Fabiano-Tixier & F. Chemat, 2017. A green analytical chemistry approach for lipid extraction: computation methods in the selection of green solvents as alternative to hexane. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(14), 3527-3539.
- Cross, K. J., N. L. Huq, J. E. Palamara, J. W. Perich & E. C. Reynolds, 2005. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 15362-15369.
- Hoyle, N. T. & J. H. Merritt, 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of food Science*, 59(1), 76-79.
- Idowu, A. T., S. Benjakul, S. Sinthusamran, T. Sae-leaw, N. Suzuki, Y. Kitani & P. Sookchoo, 2020. Effect of alkaline treatment on characteristics of bio-calcium and hydroxyapatite powders derived from salmon bone. *Applied Sciences*, 10(12), 1-12.
- Logesh, A., M. Pravinkumar, S. Raffi & M. Kalaiselvam, 2012. Calcium and phosphorus determination in bones of low value fishes, *Sardinella longiceps* (Valenciennes) and *Trichiurus savala* (Cuvier), from Parangipettai, Southeast Coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, 254-256.
- Luu, P. & M. Nguyen, 2009. Recovery and utilization of calcium from fish bones byproducts as a rich calcium source. *Journal of Science and Technology-Vietnam Academic of Science and Technology*, 47(6), 91-103.
- Murakami, F. S., P. O. Rodrigues, C. M. T. d. Campos & M. A. S. Silva, 2007. Physicochemical study of CaCO₃ from egg shells. *Food Science and Technology*, 27(3), 658-662.
- Panase, P. & K. Mengumphan, 2015. Growth performance, length-weight relationship and condition factor of backcross and reciprocal hybrid catfish reared in net cages. *International Journal of Zoological Research*, 11(2), 57-64.
- Shi, P., M. Liu, F. Fan, C. Yu, W. Lu & M. Du, 2018. Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts. *Materials Science and Engineering*, 90, 706-712.

- Spiro, M. & W. P. Griffith, 1997. The mechanism of hydrogen peroxide bleaching. *Textile Chemist and Colorist*, 29(11), 12-13.
- Suwansakornkul, P. & Jongrittiporn, S. (2012). *Value-added Products from Processing Waste of Pla Mong (Pangasius bocourti)*. (1/2012). Fishery Technological Development Division: Department of Fisheries. (in Thai)
- Vázquez, J. A., I. Rodríguez-Amado, M. I. Montemayor, J. Fraguas, M. D. P. González & M. A. Murado, 2013. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. *Marine Drugs*, 11(3), 747-774.



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	เจนจิรา นิเวศน์
เกิดเมื่อ	29 มกราคม 2539
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2561 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พ.ศ. 2557 จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนวมินทราชู ทิศ พายัพ จังหวัดเชียงใหม่

