



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผงกระดูกปลากระตุ้นทรานสกลูตามิเนสจากปลา
เพื่อพัฒนาคุณภาพของไส้กรอกอิมัลชันจากปลา
Fish bone powders activated fish transglutaminase
to improve qualities of fish emulsion sausage

โดย

นางสาวบังอร เหม้ง

31 ตุลาคม 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผงกระดูกปลากระตุ้นทรานสกลูตามิเนสจากปลา
เพื่อพัฒนาคุณภาพของไส้กรอกอิมัลชันจากปลา
Fish bone powders activated fish transglutaminase
to improve qualities of fish emulsion sausage

โดย

นางสาวบังอร เหม้ง

คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปการวิจัย (Executive summary)

รหัสโครงการ	MRG5380082
ชื่อโครงการ	ผงกระดูกปลากระตุ้นทรานสกลูตามิเนสจากปลา เพื่อพัฒนาคุณภาพของไส้กรอกอิมัลชันจากปลา Fish bone powders activated fish transglutaminase to improve qualities of fish emulsion sausage
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน	นางสาวบังอร เหม้ง คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย Miss Bung-Orn Hemung, Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Nong Khai Campus
E-mail address	bunhem@nkc.kku.ac.th , hemung3@gmail.com
ระยะเวลา	ตุลาคม 2553 - ตุลาคม 2557

การเก็บเกี่ยวกระดูกปลาซึ่งเป็นวัสดุที่เหลือจากกระบวนการแปรรูปปลาเพื่อเป็นแหล่งของแคลเซียมธรรมชาติเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและส่งเสริมสมบัติเชิงหน้าที่ในผลิตภัณฑ์อาหารเป็นหนึ่งในแนวทางการจัดการของเสียจากอุตสาหกรรมเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและเป็นการใช้ประโยชน์ทรัพยากรสัตว์น้ำอย่างคุ้มค่า ดังนั้นการแปรรูปกระดูกปลาให้มีศักยภาพในการเป็นสารเจือปนอาหารที่ก่อให้เกิดสมบัติเชิงหน้าที่อันพึงประสงค์ต่อผลิตภัณฑ์โปรตีนเจลาจากปลาจึงควรได้รับการศึกษา

กระดูกปลาเกล็ดเงินและปลานิลที่ถูกเตรียมให้อยู่ในรูปผงสามารถเป็นแหล่งของแร่ธาตุธรรมชาติ โดยเฉพาะแคลเซียมได้ดีหากมีการกำจัดอินทรีย์สารออกอย่างเหมาะสมซึ่งทำได้โดยการแช่กระดูกปลาในสารละลายด่างร้อน วิธีดังกล่าวช่วยกำจัดไขมันและโปรตีนออกจากกระดูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้ปริมาณเถ้าเพิ่มขึ้นทำให้ผงกระดูกที่ได้มีศักยภาพเป็นแหล่งของแร่ธาตุได้เป็นอย่างดี สารละลายด่างยังช่วยกัดกร่อนพื้นผิวของผงกระดูกให้มีความพรุนและเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้มากขึ้นได้จึงน่าจะทำให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมละลายได้ออกมาเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์เชิงโภชนาการและส่งเสริมสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนได้ การแช่กระดูกปลาในสารละลายด่างยังทำให้ได้ผงกระดูกที่มีสีเหลืองอมน้ำตาลเพิ่มขึ้นทำให้มีศักยภาพในการเป็นสารเจือปนอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและส่งเสริมสมบัติเชิงหน้าที่อันพึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์โปรตีนที่มีสีสน เช่น ไส้กรอกอิมัลชันจากปลา

ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในผงกระดูกมีค่าค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 32 แต่แคลเซียมเหล่านั้นอยู่ในรูปของแคลเซียมที่ไม่ละลายเสียเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากพบแคลเซียมละลายได้เพียงร้อยละ 0.5-0.6 โดยผงกระดูกจากปลาเกล็ดเงินจะมีความสามารถในการละลายมากกว่าปลานิลจึงอาจนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง ในขณะที่ผงกระดูกปลานิลอาจต้องผ่านกระบวนการสกัดด้วยกรดอะซิติกเสียก่อนโดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดอยู่ที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ด้วยเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ได้สารละลายที่มีแคลเซียมละลายได้เพิ่มขึ้นถึง 13 เท่าจากการสกัดด้วยน้ำ

แคลเซียมละลายได้จากกระดูกปลาเกล็ดเงินที่สกัดด้วยน้ำแม้มีปริมาณไม่มากนักแต่ก็ยังมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เร่งการเชื่อมข้ามของโปรตีน (ทรานสกลูตามิเนส) โดยการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวส่งผลให้เกิดการเชื่อมข้ามโปรตีนนำมาซึ่งการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อิมัลชันเจลาจากโปรตีนปลาได้ การเสริมผงกระดูกปลาในไส้กรอกอิมัลชันจากปลาที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 จึงได้รับการประเมินความเป็นไปได้โดยพิจารณาจากผลกระทบต่อปัจจัยคุณภาพ คุณค่าทางโภชนาการ และการยอมรับของผู้บริโภค ผลจากการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการเสริมผงกระดูกปลาในไส้กรอกไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบหลักทางเคมีแต่อย่างใด นอกจากนั้นยังทำให้แคลเซียมทั้งหมดเพิ่มขึ้นถึง 15 เท่า ส่งผลให้ไส้กรอกอิมัลชันที่ได้จัดเป็นผลิตภัณฑ์แคลเซียมสูงเนื่องจากมีปริมาณแคลเซียมต่อหนึ่งหน่วยบริโภคมากกว่าร้อยละ 20 ของปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน นอกจากนั้นเนื้อสัมผัสของไส้กรอกก็ได้รับการส่งเสริมให้ดีขึ้นโดยเฉพาะความแข็งและความเหนียว ผลดังกล่าวเชื่อว่าน่าจะเกิดจากการเชื่อมข้ามโปรตีนกล้ามเนื้อที่เร่งโดยเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้ที่จากผงกระดูกปลาเกล็ดเงิน ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาเสริมผงกระดูกปลาได้รับการยอมรับในภาพรวมเพิ่มมากขึ้นเมื่อประเมินโดยผู้บริโภคเนื่องจากการได้รับการยอมรับด้านเนื้อสัมผัสและรสชาติเพิ่มขึ้น

ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพทางการตลาดของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาแคลเซียมสูงที่ผลิตโดยการนำวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปปลาสร้างมูลค่าเพิ่มอันจะก่อให้เกิดแนวทางในการสร้างอุตสาหกรรมต่อเนื่องจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลาซึ่งเป็นกลยุทธ์ในการจัดการของเสียจากอุตสาหกรรมอย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ปลาเกล็ดเงิน ปลานิล ผงกระดูกปลา ทรานสกลูตามิเนส ไส้กรอกปลา

บทคัดย่อ

กระดุกปลาเกล็ดเงินและปลานิลได้ถูกนำมาจัดสารอินทรีย์ด้วยการให้ความร้อนในน้ำและสารละลายต่างเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนให้ความร้อนสูงภายใต้หม้อนึ่งความดัน (121 องศาเซลเซียส, 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน บดเป็นผงและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 38 ไมโครเมตร ผลวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีพบว่าการใช้สารละลายต่างช่วยกำจัดไขมันและโปรตีนได้มากกว่าส่งผลให้ค่าในผงกระดุกจากปลาเกล็ดเงินหรือปลานิลมีค่าสูงขึ้น การสั่นของโมเลกุลภายใต้รังสีอินฟราเรดพบว่าไม่แตกต่างกันสำหรับปลาเกล็ดเงิน แต่ผงกระดุกปลานิลพบการดัดแปรหมู่เชิงหน้าที่ของสารอินทรีย์เมื่อเตรียมด้วยสารละลายต่าง นอกจากนั้นผงกระดุกปลาประกอบด้วยไฮดรอกซีแอพพาไทท์ พื้นผิวของผงกระดุกปลาที่ได้จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่งกราดทำให้เห็นว่าการใช้สารละลายต่างส่งผลให้พื้นผิวมีลักษณะผุกร่อนในขณะที่การใช้น้ำจะทำให้ได้พื้นผิวที่มีความหนาแน่นและแข็งแรง สีของผงกระดุกที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องวัดสีพบว่าการใช้สารละลายต่างทำให้ความสว่างลดลงและค่าความเป็นสีแดงและเหลืองเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้น้ำ แคลเซียมทั้งหมดในผงกระดุกปลาทั้งสองชนิดมีค่าร้อยละ 32 แต่แคลเซียมละลายได้มีค่าเพียงร้อยละ 0.52-0.6 เมื่อสกัดผงกระดุกต่อน้ำด้วยสัดส่วน 1:4 แคลเซียมละลายได้จากผงกระดุกปลาเกล็ดเงินมีค่ามากกว่าปลานิลชี้ให้เห็นว่าสามารถถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง

การสกัดแคลเซียมจากผงกระดุกปลานิลด้วยกรด 5 ชนิด (กรดกำมะถัน กรดเกลือ กรดไนตริก กรดอะซิติกและกรดซิตริก) จึงได้รับการศึกษา และพบว่าความสามารถในการสกัดแคลเซียมของกรดน้ำส้มสายชูมีความเหมาะสมต่อการสกัดแคลเซียมจากกระดุกปลาเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมต่อการสกัดคือ 0.25 โมลาร์และ 48 ชั่วโมง เมื่อสกัดแคลเซียมที่สภาวะดังกล่าวด้วยสัดส่วน 1:20 พบว่ามีความเข้มข้นแคลเซียมเป็น 2,372 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการใช้น้ำสกัดถึง 13 เท่า

แคลเซียมละลายได้จากผงกระดุกปลาเกล็ดเงินที่สกัดด้วยน้ำสามารถกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูทาไมเนสได้ถึงแม้ว่าจะให้กิจกรรมที่น้อยกว่าการใช้แคลเซียมคลอไรด์ การเชื่อมข้ามของโปรตีนที่ถูกเร่งด้วยทรานสกลูทาไมเนสในสภาวะที่มีแคลเซียมละลายได้ได้ถูกพิสูจน์โดยแบบแผนของโปรตีนที่ได้จากการแยกภายใต้สนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโตโฟลิซิส ผงกระดุกปลาเกล็ดเงินได้ถูกเสริมในไส้กรอกปลาที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ผลจากการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีพบว่าการเติมผงกระดุกไม่กระทบต่อปริมาณความชื้น ไขมันและโปรตีนแต่ปริมาณเถ้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่งผลให้ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในไส้กรอกเพิ่มขึ้น 15 เท่า เมื่อเทียบกับสูตรควบคุม สีของไส้กรอกไม่มีความแตกต่างกันเมื่อพิจารณาเฉพาะค่าความสว่างแต่ค่าความเป็นสีเหลืองและค่าความเป็นสีแดงเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ผลจากการวิเคราะห์แบบแผนเนื้อสัมผัสพบว่าค่าความแข็งและความเหนียวมีค่าเพิ่มมากขึ้นในตัวอย่างที่เสริมผงกระดุก ผลจากการประเมินความชอบของผู้บริโภคพบว่าการเสริมผงกระดุกได้รับคะแนนความชอบด้านสี เนื้อสัมผัส รสชาติ และความชอบโดยรวมเพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: ปลาเกล็ดเงิน ปลานิล ผงกระดุกปลา ทรานสกลูทาไมเนส ไส้กรอกปลา

Abstract

Silver carp and tilapia bone samples were soaked in either hot water or hot alkaline (NaOH, 0.8%) for 1 h and were softened in an autoclave (121 C/15 lb.cm²) for 1 h. The obtained bones were dried in an oven dryer at 100 C for 12 h, ground into powder, sieved through the sieving mesh to collect only particle smaller than 38 µm. The proximate analysis revealed that alkaline treatment eliminated effectively the organic matters (fat and protein), resulting in the higher ash content. The vibrational spectroscopy showed similar signal between tilapia bones, while the modification of organic compounds by alkaline was found in silver carp bones. This technique also indicated that the bone powder comprised of hydroxyapatite. The microstructure showed the corrosive surface in sample treated with alkaline but the compact structure was observed in sample treated with water. Color measurement showed that the lightness of bone powders decreased when it is treated with alkaline, while the redness and yellowness were increased.

Total calcium in bone powder treated with alkaline was found at 32 %, regardless fish species. The soluble calcium was observed at only 176 and 189 mg/L for tilapia and silver carp, when those powders were extracted by water (powder:water at 1:4). Due to higher calcium solubility, silver carp bone powder may be applied directly in food system. Calcium extraction from tilapia bone powder with 5 types of acid solution (sulfuric acid, hydrochloric acid, nitric acid, acetic acid, and citric acid) was investigated. An acetic acid was considered to be the suitable acid for calcium extraction for food applications. The suitable concentration and extraction time were optimized to be 0.25 M and 48 h. When tilapia bone was extracted (powder:acid at 1:20), the calcium content was observed at 2,372 mg/L. This soluble calcium extracted by acetic acid was higher than that extracted with water for 13 fold.

The water soluble calcium from silver carp bone activated TGase. Cross-linking of myofibrillar protein catalyzed by TGase in the presence of soluble calcium was evidenced by the changes of protein patterns, assessed by SDS-PAGE. Silver carp bone powder was incorporated into fish sausage at 1% (w/w) prior being compared its qualities to the control. The addition of fish bone powder did not affect the moisture, fat, and protein contents. The ash content increased significantly and total calcium increased for 15 fold when comparing to the control. The color value was not changed when only lightness was considered. The yellowness and redness values were increased significantly. Texture profile analysis showed that the hardness and gumminess values of sample were improved by fish bone powder. The product acceptability, evaluated by consumer test, showed that incorporation of fish bone powder could increase the overall acceptance. This was due to an increase in the preference regarding the color, texture and taste of the sample.

Key words: silver carp, tilapia, fish bone powder, transglutaminase, fish sausage

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการปฏิบัติงานวิจัย รวมถึงนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารและอุตสาหกรรมเกษตรที่อำนวยความสะดวกระหว่างดำเนินการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด

นักวิจัยที่ปรึกษา คือ รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล สาขาวิชาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ Professor Dr. Koo Bok Chin, Chonnam National University, Korea โปรดรับคำขอบคุณร่วมกันในการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวางแผนโครงการวิจัย การศึกษาวิจัย และการตรวจอ่านนิพนธ์ต้นฉบับเพื่อส่งผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ขอขอบคุณ ดร. มานพ ศรีอุทธา คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์เทคนิค FT-IR และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

ขอขอบคุณ ดร. มัลลิกา จันทรังษี และ ดร. ธัญชัย ดาศรี ในการอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับการบริหารจัดการเงินทุนระหว่างดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ กองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับการสนับสนุนเงินทุนวิจัย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยผ่านทุนวิจัยด้วยรหัสโครงการ MRG 5380082 จนทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

บังอร เหม้ง

31 ตุลาคม 2557

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปการวิจัย (Executive summary)	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์	5
บทที่ 2 ทัศนวิสัยวรรณกรรม	6
2.1 องค์ประกอบของกระดูกปลา	6
2.2 การใช้ประโยชน์จากกระดูกปลา	9
2.2.1 การใช้ประโยชน์เชิงการแพทย์	9
2.2.2 การใช้ดูดซับโลหะหนัก	10
2.2.3 การใช้เป็นอาหารสัตว์	11
2.2.4 การใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร	12
2.3 ผงกระดูกปลาและคุณค่าทางโภชนาการ	14
2.4 การใช้ผงกระดูกปลาปรับปรุงคุณภาพโปรตีนเจลาตินจากปลา	15
2.5 การใช้ผงกระดูกปลากระตุ้นการทำงานของทรานสกลูตามิเนสจากปลา	17
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	18
3.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี	18
3.2 ตอนที่ 1 คุณลักษณะของกระดูกปลา	18
3.2.1 การศึกษาคุณลักษณะของผงกระดูกปลา	18
3.2.1.1 การเตรียมผงกระดูกปลา	18
3.2.1.2 การวิเคราะห์ผงกระดูกปลา	19
3.2.1.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	19
3.2.1.2.2 การวิเคราะห์สี	20
3.2.1.2.3 การวิเคราะห์ FT-IR	20
3.2.1.2.4 ภาพถ่ายภาพกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	20
3.2.1.2.5 การวิเคราะห์แคลเซียมทั้งหมดและแคลเซียมละลายได้	20
3.2.2 สภาวะเหมาะสมต่อการสกัดแคลเซียมจากผงกระดูกปลานิลด้วยกรด	20
3.2.2.1 การศึกษาชนิดของกรดที่เหมาะสม	20
3.2.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซิติก	21

เรื่อง	สารบัญ (ต่อ)	หน้า
	3.2.2.1 การศึกษาเวลาในการสกัด	21
	3.2.3 การสกัดแคลเซียมจากผงกระดูกปลานิลด้วยกรดอะซิติกที่สภาวะเหมาะสม	21
	3.2.3.1 การสกัดแคลเซียมด้วยกรดอะซิติก	21
	3.2.3.2 การสกัดวิเคราะห์แคลเซียมในสารสกัด	21
	3.3 ตอนที่ 2 ผลของกระดูกปลาเกล็ดเงินต่อคุณภาพไส้กรอกปลาเกล็ดเงิน	21
	3.3.1 การเตรียมผงกระดูกปลาเกล็ดเงิน	21
	3.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมทรานสกลูทามิเนสที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้จากกระดูกปลาเกล็ดเงิน	21
	3.3.3 การวิเคราะห์การเชื่อมข้ามโปรตีนด้วยทรานสกลูทามิเนสที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้จากกระดูกปลาเกล็ดเงิน	22
	3.3.4 การผลิตไส้กรอกปลา	23
	3.3.5 การวิเคราะห์คุณภาพไส้กรอกปลา	23
	3.3.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	23
	3.3.5.2 การตรวจวัดค่าสี	23
	3.3.5.3 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส	23
	3.3.5.4 การประเมินทางประสาทสัมผัส	24
	3.3.6 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ	24
	บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย	25
	4.1 ตอนที่ 1	25
	4.1.1 คุณลักษณะของผงกระดูกปลา	25
	4.1.1.1 องค์ประกอบทางเคมี	26
	4.1.1.2 สี	28
	4.1.1.3 FT-IR	29
	4.1.1.4 ภาพถ่ายภาพกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	30
	4.1.1.5 แคลเซียม	32
	4.1.2 การสกัดแคลเซียมจากกระดูกปลานิลด้วยกรด	34
	4.1.2.1 ผลของชนิดกรด	34
	4.1.2.2 ผลของความเข้มข้นกรดอะซิติก	35
	4.1.2.3 ผลของเวลา	35
	4.1.3 สรุป	36
	4.2 ตอนที่ 2 ผลของผงกระดูกปลาเกล็ดเงินต่อคุณภาพไส้กรอกปลาเกล็ดเงิน	37
	4.2.1 กิจกรรมทรานสกลูทามิเนสที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้	37

เรื่อง	สารบัญ (ต่อ)	หน้า
	4.2.2 การเชื่อมข้ามโปรตีนด้วยทรานสกลูทามิเนสและแคลเซียมละลายได้	39
	4.2.3 คุณภาพไส้กรอกปลา	40
	4.2.3.1 องค์ประกอบทางเคมี	42
	4.2.3.2 สี	43
	4.2.3.3 เนื้อสัมผัส	43
	4.2.3.4 การประเมินทางประสาทสัมผัส	46
	4.3 สรุป	47
บทที่ 5 บทสรุป		48
ข้อเสนอแนะ		49
เอกสารอ้างอิง		50
ภาคผนวก		54
	ผลผลิตที่ได้จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว	55
	นิพนธ์ต้นฉบับสำหรับส่งผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ	56

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
ตารางที่ 1	องค์ประกอบของกระดุกปลาชนิดต่างๆ	7
ตารางที่ 2	แบบแผนของกรดอะมิโนที่พบในกระดุกปลาชนิดต่างๆ	8
ตารางที่ 3	แร่ธาตุที่พบในกระดุกปลาชนิดต่างๆ	9
ตารางที่ 4	องค์ประกอบทางเคมีของกระดุกและอาหารเสริมแคลเซียม	13
ตารางที่ 5	จุลินทรีย์ในผงกระดุกปลานิลเทียบกับมาตรฐานอาหารเสริมแคลเซียม	13
ตารางที่ 6	องค์ประกอบทางเคมีของผงกระดุกปลาเกล็ดเงินที่ผ่านการต้มน้ำและต้มต่าง	27
ตารางที่ 7	องค์ประกอบทางเคมีของผงกระดุกปลานิลที่ผ่านการต้มน้ำและต้มต่าง	27
ตารางที่ 8	ค่าสีของผงกระดุกปลาเกล็ดเงินที่ผ่านต้มน้ำและต่าง	29
ตารางที่ 9	ค่าสีของผงกระดุกปลานิลที่ผ่านต้มน้ำและต่าง	29
ตารางที่ 10	ผลของชนิดกรดต่อการสกัดแคลเซียมจากกระดุกปลานิล	34
ตารางที่ 11	ผลของความเข้มข้นกรดอะซิติกต่อการสกัดแคลเซียมจากกระดุกปลานิล	35
ตารางที่ 12	องค์ประกอบทางเคมีของไส้กรอกอิมัลชันเสริมและไม่เสริมผงกระดุกปลาเกล็ดเงิน	42
ตารางที่ 13	ค่าสีของไส้กรอกปลาสูตรเสริมและไม่เสริมผงกระดุกปลาเกล็ดเงิน	43
ตารางที่ 14	แบบแผนเนื้อสัมผัสของไส้กรอกอิมัลชันเสริมและไม่เสริมผงกระดุกปลาเกล็ดเงิน	44
ตารางที่ 15	คุณลักษณะด้านการยอมรับของไส้กรอกเสริมและไม่เสริมผงกระดุกปลา	46

สารบัญรูป

รูป		หน้า
รูปที่ 1	ปลาเกล็ดเงิน (ก) และปลานิล (ข)	19
รูปที่ 2	ผงกระดูกปลาเกล็ดเงิน (ก) และปลานิล (ข) ที่มีขนาดเล็กกว่า 38 ไมโครเมตรที่ได้จากการต้ม น้ำ และต่าง	25
รูปที่ 3	FT-IR spectra ของผงกระดูกปลาเกล็ดเงิน (ก) และปลานิล (ข) ที่ได้จากการต้ม น้ำ (ล่าง) และต่าง (บน)	31
รูปที่ 4	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของผงกระดูกปลาเกล็ดเงินที่เตรียมได้จากการต้ม น้ำ (ก) และสารละลายต่าง (ข) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า	32
รูปที่ 5	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของผงกระดูกปลาที่เตรียมได้จากการต้ม น้ำ (ก) และสารละลายต่าง (ข) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า	32
รูปที่ 6	ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในผงกระดูกปลานิลและปลาเกล็ดเงินที่เตรียมได้จากการต้มด้วยสารละลายต่าง	33
รูปที่ 7	ปริมาณแคลเซียมละลายได้จากผงกระดูกปลานิลและปลาเกล็ดเงินที่เตรียมได้จากการต้มด้วยสารละลายต่างเมื่อละลายน้ำด้วยสัดส่วน 1:4	33
รูปที่ 8	กิจกรรมของทรานสกลูตามิเนสอย่างหายาจากปลาเกล็ดเงินที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้จากผงกระดูกปลาและแคลเซียมคลอไรด์	38
รูปที่ 9	แบบแผนของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาที่บ่มในสภาวะที่มีและไม่มีแคลเซียมละลายได้	40
รูปที่ 10	ใส่กรอกอิมัลชันจากปลาเงินที่เติมและไม่เติมผงกระดูกปลาเกล็ดเงิน	41

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

อุตสาหกรรมประมง (Fishery industry) เป็นอุตสาหกรรมที่เน้นการใช้ประโยชน์จากปลาเพื่อเป็นอาหารผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ปลาแห้ง ปลาหมัก (น้ำปลาและปลาซึ่ม) ปลาเค็ม เนื้อปลาแดดเดียว เนื้อปลารมควัน เนื้อปลาแช่เยือกแข็ง เนื้อปลาบดแช่เยือกแข็ง (Surimi) เป็นต้น จากการประมาณการพบว่าปริมาณปลาที่จับจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติและปลาที่เลี้ยงเพื่อการค้าที่ได้นำเข้าสู่กระบวนการใช้ประโยชน์ทั่วโลกประมาณ 148 ล้านตันในปี ค.ศ. 2010 การใช้ประโยชน์ดังกล่าวก่อให้เกิดของเสียประมาณ 20 ล้านตัน (FAOSTAT, 2012) ของเสียดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุในการสร้างผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและกลายเป็นมลภาวะได้หากไม่ได้รับการจัดการอย่างเหมาะสมซึ่งกำลังเป็นปัญหาหลักสำหรับเมืองใหญ่ที่เป็นแหล่งอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำ (Ozawa and Suzuki, 2002) มีรายงานว่า กระบวนการแปรรูปปลาก่อให้เกิดของเสียในรูปของแข็ง (Solid waste) คิดเป็นร้อยละ 30-40 ของปริมาณการผลิต (Kongsri et al., 2013) ของเสียดังกล่าวมีองค์ประกอบหลักเป็นกระดูกและมีปริมาณร้อยละ 10-15 ของน้ำหนักปลา (Yin and Park, 2014)

กระดูกปลา (Fish bone) ประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ร้อยละ 30 และ 70 ตามลำดับ สารประกอบอนินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไฮดรอกซีแอพพาไทท์ (Hydroxyapatite) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ นอกจากจะพบในกระดูกแล้วแอพพาไทท์ยังพบในเนื้อเยื่อที่มีความแข็งแรงสูง เช่น เปลือกหอย ปะการัง แร่ และเกล็ดปลา เป็นต้น สารดังกล่าวถูกสังเคราะห์มาจาก $[Ca(OH)_2]$ และ $[H_3PO_4]$ หรือ $[Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O]$ และ $[Ca(OH)_2]$

การจัดการและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมแปรรูปปลายังเป็นไปอย่างไม่เต็มประสิทธิภาพมากนัก โดยปัจจุบันจะนิยมขายของเสียเหล่านี้ในรูปของกระดูกปนเพื่อนำไปเป็นส่วนผสมในสูตรอาหารสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงปลา สัตว์เศรษฐกิจ (สุกร ไก่) หรือแม้กระทั่งสัตว์เลี้ยว (สุนัขและแมว) เป็นต้น (Malde et al., 2010) นอกจากนั้นยังมีความพยายามในการนำเอากระดูกปลามาผลิตเป็นตัวดูดซับธรรมชาติ (Natural adsorbent) โดยการสกัดเอาไฮดรอกซีแอพพาไทท์มาเป็นสารดูดซับโลหะหนัก เช่น การดูดซับสังกะสี (Zn^{2+}) จากน้ำทิ้ง (Lim et al., 2012) การดูดซับทองแดง (Cu^{2+}) และการดูดซับซีรีเนียม (Se) (Kongsri et al., 2013)

นอกจากการใช้ประโยชน์จากกระดูกปลาเพื่อเป็นอาหารสัตว์และเพื่อเป็นตัวดูดซับแล้ว กระดูกปลายังมีศักยภาพในการเป็นแหล่งแร่ธาตุธรรมชาติที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการของกระดูกและฟัน โดยเฉพาะแคลเซียมและฟอสฟอรัส งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากกระดูกปลาเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้มีการศึกษาอยู่บ้างแต่ไม่กว้างขวางนัก โดยได้มีนักวิจัยศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตผงกระดูกปลานิให้มีความคุณภาพและศักยภาพเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทแร่ธาตุ (Techochatchawal, Therdthai, and Khotavivattana, 2009) นอกจากนั้นสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกระดูกปลา Hoki และปลาหมอตทะเล (Seaperch) เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมแร่ธาตุแคลเซียมก็ได้รับการศึกษา (Phiraphinyo et al., 2006) แต่กระบวนการผลิตผงกระดูกปลาเพื่อเป็นแหล่งของแคลเซียมโดยตรงอาจมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การลำเลียงฤทธิ์ทางชีวภาพ และผลข้างเคียง ตลอดจนการยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นการผลิตผลิตภัณฑ์

เสริมแร่ธาตุจากผงกระดูกปลาจึงยังไม่ได้รับการส่งเสริมให้เกิดขึ้นในระดับอุตสาหกรรม

อย่างไรก็ตาม แนวทางในการใช้ประโยชน์แคลเซียมธรรมชาติจากกระดูกปลาเพื่อผลดีต่อสุขภาพก็ยังไม่ได้หยุดนิ่งเสียทีเดียว โดยมีนักวิจัยได้พยายามผลิตกระดูกปลาให้มีอนุภาคระดับนาโนเมตร (Nano scale fish bone) แล้วนำไปเป็นส่วนผสมในการผลิตโปรตีนเจลจากเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งซึ่งพบว่าก่อให้เกิดการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้ค่าความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของโปรตีนเจลมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมกระดูกผงที่มีอนุภาคระดับนาโนเมตร (Tao and Park, 2014) การปรับปรุงเนื้อสัมผัสดังกล่าวเกิดขึ้นได้เนื่องจากแคลเซียมในผงกระดูกมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเชื่อมข้ามของโปรตีนซึ่งมีอยู่ในกล้ามเนื้อปลาอยู่แล้ว เอนไซม์ชนิดนั้นคือ ทรานสกลูตามิเนส

ทรานสกลูตามิเนส (Transglutaminase) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในระบบคือ Protein-glutamine γ -glutamyltransferase, E.C. 2.3.2.13 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งการย้ายหมู่เอซิล (Acyl transfer) ของหมู่เอไมด์ของกลูตามีนที่อยู่บนโครงสร้างของเปปไทด์หรือโปรตีน (Glutamyl peptide/protein) ไปยังหมู่เอมีนเชิงเดี่ยว (Primary amine) หรือเปปไทด์หรือโปรตีนที่มีไลซีนเป็นองค์ประกอบ (Lysyl peptide/protein) กระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิดการเชื่อมข้ามของสายโปรตีนด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Covalent bonds) ก่อให้เกิดการเกาะตัวกันของโปรตีนทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เอนไซม์ชนิดนี้พบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดและทำหน้าที่หลายอย่างในระบบสรีรวิทยา มีรายงานว่าเอนไซม์ชนิดนี้อาจก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพได้โดยเป็นหนึ่งในสาเหตุของโรคภูมิแพ้โปรตีนข้าวสาลี (Celiac disease) โดยจะไปเร่งให้เกิดการดัดแปร (Modify) โปรตีนในข้าวสาลีซึ่งมีกลูตามีนเป็นองค์ประกอบค่อนข้างมากทำให้ได้อนุพันธ์โปรตีนที่มีสมบัติในการก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อระบบทางเดินอาหาร ในทางตรงกันข้ามทรานสกลูตามิเนสในระบบเลือดซึ่งมีชื่อเรียกว่า Factor XIII ได้ถูกรายงานว่ามีบทบาทในการช่วยสมานแผลและเร่งให้เลือดหยุดไหลได้เร็วขึ้นเมื่อบาดแผลได้รับการฉีกขาดโดยเอนไซม์ดังกล่าวจะทำหน้าที่เร่งการเชื่อมข้ามโปรตีนทำให้เกิดเป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่มีโมเลกุลใหญ่จนทำให้เลือดหยุดไหลได้ในที่สุด โดยการทำงานดังกล่าวเกิดขึ้นร่วมกับวิตามินเค ทรานสกลูตามิเนสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิดตั้งแต่จุลินทรีย์ พืช สัตว์น้ำ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ขนาดและคุณสมบัติทางเอนไซม์จะแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา การศึกษาเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในแต่ละแหล่งจึงมุ่งเน้นการส่งเสริมและการควบคุมกิจกรรมเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ในวงการต่างๆ รวมถึงวงการอุตสาหกรรมแปรรูปปลา

บทบาทของทรานสกลูตามิเนสในอุตสาหกรรมแปรรูปปลาได้มีการศึกษากันพอสมควร มีรายงานการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์โปรตีนเจลจากเนื้อปลาที่ได้จากอุตสาหกรรมเนื้อปลาบดซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารพื้นเมืองของชาวญี่ปุ่น เช่น คามาโบโกะ (Kamaboko) ชิคุวะ (Chikuwa) ปูอัด (Crab stick) หรือเนื้อปูเทียม (Imitation crab) ลูกชิ้น (Fish ball) เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากเนื้อปลาเศรษฐกิจชนิดต่างๆ ค่อนข้างมากและยิ่งกว่านั้นยังได้มีการค้นพบทรานสกลูตามิเนสจากแหล่งใหม่คือจากแบคทีเรีย *Streptovorticillium* sp. ทำให้มีศักยภาพในการผลิตค่อนข้างสูง การค้นพบดังกล่าวนำมาสู่การผลิตเอนไซม์เชิงการค้าภายใต้สิทธิบัตร/เครื่องหมายการค้าของบริษัท อายิโนะโมะโตะ จำกัด (Ajinomoto Co., Ltd.) การทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากจุลินทรีย์เอื้ออำนวยต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้โดยไม่ต้องอาศัยแร่ธาตุหรือไอออนเป็นตัวกระตุ้น ซึ่งผิดกับเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลาที่ต้องการแคลเซียมในการกระตุ้นการทำงาน ซึ่งระดับความต้องการของแคลเซียมขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและแหล่งที่อยู่ของปลา การกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูตามิเนสได้โดยใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติโดยเฉพาะแคลเซียมจากกระดูกปลาจึงเป็นหัวข้อวิจัยที่น่าสนใจ โดยรายงานวิจัยลักษณะดังกล่าวยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางนัก และ

ผลิตภัณฑ์ที่ศึกษายังจำกัดอยู่เฉพาะระบบโปรตีนเจล หากแต่ระบบอาหารที่เป็นเจลจากอิมัลชัน (Emulsion gel) ยังไม่ได้รับการรายงานโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอิมัลชันจากปลา

ไส้กรอกอิมัลชันจากปลา (Fish emulsion sausage) เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทเจลของอิมัลชันที่เกิดระหว่างเนื้อปลาและไขมันที่ผ่านการอัดใส่ ให้ความร้อนเพื่อทำให้สุก (Cook) พร้อมกับการเปลี่ยนให้ของผสมอิมัลชันกลายเป็นเจล ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีจุดเริ่มต้นจากประเทศในแถบยุโรปโดยใช้เนื้อสัตว์บกเป็นหลักและที่เป็นที่รู้จักได้แก่ ไส้กรอกแฟรงเฟิร์ต (Frankfurter) ไส้กรอกเวียนนา (Vienna sausage) เป็นต้น ปัจจุบันไส้กรอกปลาเริ่มได้รับความนิยมมากขึ้นเนื่องจากโปรตีนปลาเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพเพราะโครงสร้างเอื้ออำนวยต่อการถูกย่อยมากกว่าโปรตีนจากสัตว์ใหญ่ ดังนั้นไส้กรอกปลาจึงจัดเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ (Healthy food) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อกระบวนการผลิตได้มีลดปริมาณน้ำมันลงจากสูตรปกติที่ใช้ในการผลิตไส้กรอกจากเนื้อสัตว์ทั่วไป ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจึงเหมาะอย่างยิ่งสำหรับผู้บริโภคที่มีความไวต่อโรคความดันและโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดและโรคหัวใจ

เทคโนโลยีที่สำคัญในการผลิตไส้กรอกอิมัลชันได้แก่กระบวนการสร้างระบบอิมัลชันระหว่างโปรตีนในเนื้อสัตว์กับไขมันโดยโปรตีนต้องมีคุณภาพดีจะทำให้พร้อมต่อการเกิดสมบัติเชิงหน้าที่ดีโดยเฉพาะการห่อหุ้มเม็ดไขมันระหว่างการเกิดอิมัลชันหรือแม้กระทั่งการเกิดเจลระหว่างการให้ความร้อน ระหว่างการผลิตจะต้องมีการเติมเกลือลงไปเพื่อให้เกลือไปละลายโปรตีนเส้นใย (Myofibrillar proteins) เมื่อโปรตีนดังกล่าวอยู่ในสภาวะละลายแล้วก็พร้อมที่จะห่อหุ้มเม็ดไขมันไว้ทำให้เกิดการกระจายตัวของเม็ดไขมันเล็กๆ อย่างทั่วถึงเกิดเป็นระบบอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (Oil in water emulsion) เมื่อได้รับความร้อนโปรตีนในอิมัลชันจะเกิดการเสียสภาพและเกิดสมบัติเชิงหน้าที่อีกชนิดหนึ่ง คือการเกิดเจล โดยโปรตีนที่ห่อหุ้มเม็ดไขมันอยู่จะเกิดการจับตัวกันเป็นเจลที่ห่อหุ้มเม็ดไขมันไว้ทำให้ได้ไส้กรอกเนื้อเนียน

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของไส้กรอกอิมัลชันมีหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิระหว่างการผลิตซึ่งควรต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียสเพราะถ้าอุณหภูมิสูงจะทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ ค่า pH ที่เหมาะสมโดยต้องไม่เป็นกรดมากเกินไปเพราะจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ นอกจากนั้นปริมาณเกลือก็มีส่วนโดยต้องมีปริมาณที่เพียงพอต่อการละลายโปรตีนเส้นใย โดยส่วนมากไส้กรอกประเภทนี้จะมีเกลือประมาณร้อยละ 2-3 อย่างไรก็ตามการมีเกลือสูงก็อาจทำให้ผลิตภัณฑ์มีข้อจำกัดสำหรับผู้บริโภคที่มีโรคความดันโลหิตสูง และโรคไต ดังนั้นการลดเกลือจึงเป็นแนวทางในการส่งเสริมให้ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาเป็นไส้กรอกปลาเพื่อสุขภาพอย่างแท้จริง แต่การลดเกลือในสูตรไส้กรอกอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพเพราะจะทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า การผลิตไส้กรอกสูตรลดปริมาณเกลือมีความเป็นไปได้หากมีการเติมสารเติมแต่งอาหารที่ช่วยในการเกิดเจลหนึ่งในสารเติมแต่งเหล่านั้นได้แก่ เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสเชิงการค้า เป็นที่ทราบกันดีว่าในเนื้อปลามีเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสอยู่ ดังนั้นการกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพก็อาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงกระบวนการผลิตโดยไม่ต้องพึ่งเอนไซม์ทางการค้า

ปลาเกล็ดเงิน (Silver carp) มีชื่อสามัญที่เรียกอีกอย่างหนึ่งคือปลาลิ้นหรือ ปลาเล่ง โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Hypophthalmichthys molitrix* (Cuv.&Val) จัดอยู่ในกลุ่มของปลาจีนซึ่งมีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ปลาลิ้น ปลาช่ง (Bighead carp) และปลากินหญ้า (Grass carp) ปลาเกล็ดเงินเป็นปลาที่กินพืชเป็นอาหารโดยเฉพาะแพลงตอนพืช รูปพรรณสัณฐานของปลาเกล็ดเงินแสดงได้ดังรูปที่ 1 โดยส่วนหัวมีขนาดปานกลาง ปากเขี้ยวเล็กน้อยอยู่ปลายสุดของหัว ขากรรไกรล่างเฉียงขึ้นมามีเล็กน้อย ตาค่อนข้างเล็กและอยู่ใต้ระดับกึ่งกลางลำตัว ส่วนหนึ่งของเหงือกไม่เชื่อมสนิทกับแก้มส่วนล่าง มีอวัยวะ Super branchial อยู่ ซึ่งกรอง

เหงือกติดต่อกันเหมือนตะแกรงที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ ฟันที่คอหอยมีข้างละแถวๆ ละ 4 ซี่ พื้นหน้าตัดของฟันแบนเป็นร่องละเอียด ครีบหลังมีก้านครีบเดี่ยว 3 ก้าน และก้านครีบแขนง 7 ก้าน ครีบกันมีก้านครีบเดี่ยว 3 ก้าน และก้านครีบแขนง 11-14 ก้าน ครีบอกมีครีบเดี่ยว 1 ก้าน และมี ก้านครีบแขนง 17 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบเดี่ยว 1 ก้าน และมีครีบแขนง 8 ก้าน เกล็ดบนเส้นข้างลำตัวมี 110-123 เกล็ด ลำตัวรูปกระสวยแบนข้างส่วนท้องเป็นสันยาวจากอกถึงรูก้น ลำตัวส่วนหลังสีดำ เทา ส่วนอื่นๆ มีสีเงิน

การเพาะเลี้ยงและใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรมจากปลาชนิดนี้มีรายงานในประเทศจีนและอินเดียซึ่งจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีปริมาณการผลิตค่อนข้างมากเพราะเป็นปลาที่มีเนื้อสีขาวและมีรสชาติดี มีรายงานการผลิตต่อปีในประเทศจีนอยู่ที่ประมาณ 4.9 ล้านล้านตันในปี ค. ศ. 2002 โดยผลผลิตดังกล่าวได้ถูกส่งเข้าสู่อุตสาหกรรมการแปรรูปหลากหลายรูปแบบรวมทั้งเนื้อปลาแช่เยือกแข็ง การผลิตดังกล่าวจำเป็นต้องแยกกระดูกออกจึงก่อให้เกิดเป็นของเสียที่จำเป็นต้องได้รับการจัดการที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยงและใช้ประโยชน์ปลาชนิดนี้ในประเทศไทยมีรายงานว่าฟาร์มเลี้ยงปลาในกลุ่มปลาจีนมีอยู่ 613 ฟาร์มรวมเนื้อที่ 721.97 ไร่ คิดเป็นผลผลิต 200.07 ตัน (ศูนย์สารสนเทศ, 2546) แนวโน้มด้านการตลาดของปลาจีนยังคงอยู่ในสถานะที่มีปริมาณความต้องการบริโภคสูง เนื่องจากเป็นปลาที่มีรสชาติดีราคาไม่แพงมากนักและนิยมประกอบอาหารเป็นปลาจานระดับภัตตาคาร อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลาจีนในขณะนี้ ส่วนใหญ่ไม่ได้เลี้ยงปลาเป็นหลักแต่จะปล่อยเสริมเพื่อการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรในแหล่งน้ำโดยมิให้เกิดความสูญเปล่า เนื่องจากปลาจีนจะกินอาหารต่างระดับกับปลาหลัก มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วไม่ค่อยพบปัญหาโรคระบาด ดังนั้นปลาจีนจึงเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งซึ่งมีตลาดค่อนข้างจะแน่นอน อันจะเสริมสร้างความมั่นใจให้แก่ผู้เลี้ยง เมื่อแนวโน้มในการผลิตปลาเกล็ดเงินยังคงมีเพิ่มมากขึ้น

คุณค่าทางอาหารของปลาชนิดนี้ก็ได้รับการพิสูจน์และพบว่าเป็นแหล่งของแร่ธาตุ โปรตีน กรดอะมิโน และไขมันที่จำเป็นเช่น EPA และ DHA เป็นต้น (Jin and Lee, 1998) ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากปลาชนิดนี้ในระดับอุตสาหกรรมจึงได้เกิดขึ้นได้แก่ ปลากรอบ (Fish chips) เนื้อปลาตุ๋น (Stewed fish) เนื้อปลาบดล้างน้ำแช่เยือกแข็ง (Frozen surimi) รวมถึงการใช้ประโยชน์ในระดับครัวเรือน การแปรรูปปลาเกล็ดเงินเป็นผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจำเป็นต้องนำปลามาผ่านกระบวนการแล่เอาเนื้อเพื่อกำจัดกระดูกโดยเฉพาะกระดูกแกนกลางของลำตัว โดยกระดูกดังกล่าวอาจถูกนำมาแปรรูปต่อไปโดยการทอดกรอบให้เป็นขนมขบเคี้ยวในบางพื้นที่ แต่การใช้ประโยชน์ดังกล่าวก็ยังมีขนาดที่ไม่มากพอจะรองรับกับของเสียที่เกิดขึ้น ดังนั้นการศึกษาการใช้ประโยชน์จากกระดูกปลาเกล็ดเงินจึงเป็นหัวข้อที่ควรได้รับการศึกษา ได้มีการพยายามนำเทคโนโลยีมาช่วยในการแปรรูปกระดูกปลาเกล็ดเงินให้อยู่ในรูปผงโดยใช้เทคโนโลยีการบดอนุภาคเล็ก (Superfine grinding technology) จนทำให้ได้ผงกระดูกที่มีอนุภาคเฉลี่ยประมาณ 7.65 ไมโครเมตร แต่การใช้ประโยชน์ผงกระดูกที่ได้เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารยังไม่ได้ได้รับการศึกษาต่อ

ปลานิล (*Oreochromis tilapino*) เป็นปลาน้ำจืดในวงศ์ปลาหมอสี ขยายพันธุ์ได้ง่ายและมีการเพาะเลี้ยงค่อนข้างมากจนกลายเป็นปลาเศรษฐกิจเนื่องจากมีรสชาติดี ปลาชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดจากทวีปแอฟริกา พบในแหล่งน้ำจืด เช่น ห้วย หนอง คลอง บึง หรือแม้แต่พื้นที่น้ำกร่อยก็สามารถเจริญได้ พบในแถบประเทศ 수단 อูกานดา ปลานิลถูกนำเข้าสู่ประเทศไทยโดยสมเด็จพระจักรพรรดิอะกิฮิโตะแห่งญี่ปุ่นโดยทรงจัดส่งเข้ามาทูลเกล้าถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวเมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 จำนวน 50 ตัว จากนั้นพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวได้โปรดเกล้าฯ ให้ทดลองเลี้ยงปลานิลในบ่อภายในสวนจิตรลดา เป็นหนึ่งโครงการในโครงการสวนพระองค์ สวนจิตรลดา ผลจากการศึกษาพบว่าปลาดังกล่าวเจริญเติบโตได้ดี ต่อมาจึงได้พระราชทานให้กรมประมงในปี พ.ศ. 2509 เพื่อนำไปขยายพันธุ์และแจกจ่ายให้กับพสกนิกร รวมทั้งปล่อยลงแหล่งน้ำต่างๆ ตามที่เห็นว่าเหมาะสมเพื่อให้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ตามธรรมชาติ ทั้งนี้ปลานิลเป็นปลาที่มี

คุณสมบัติพิเศษที่ส่งเสริมให้เลี้ยงง่าย เนื่องจากเป็นปลาที่กินทุกอย่างและขยายพันธุ์ได้ง่าย ลักษณะทั่วไปของปลานิลเป็นปลาที่มีรูปร่างแบนคล้ายปลาหมอ ลำตัวมีลายดำและขาวสลับกัน หลังมีครีบ ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล มีลายดำพาดขวางตามลำตัว มีความยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร โดยจัดเป็นปลากินทั้งพืชและสัตว์ มีอาหารหลักเป็น ไรน้ำ ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนแมลง กุ้งฝอย และผักบุง นิสัยของปลานิลจะชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง มีความอดทนและสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี โดยทนความเค็มได้ 20 ส่วนในล้านส่วน จึงทำให้เจริญได้ในน้ำกร่อยได้ ทนค่าความเป็นกรด-ด่างได้ดีในช่วง 6.5-8.3 ทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ไม่ดีนักในที่เย็น (ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส) ดังนั้นปลานิลจึงจัดเป็นปลาในเขตร้อน (Tropical fish species) ปลานิลได้รับการขยายพันธุ์และใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในและต่างประเทศ โดยปริมาณการผลิตต่อปีมีมากพอๆกับปริมาณการผลิตปลา Salmon และ Trout รวมกัน โดยปลาดังกล่าวได้เข้าสู่อุตสาหกรรมครัวเรือนและเป็นวัตถุดิบในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ปลานิลแช่เยือกแข็ง การทำเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็ง การทำแห้ง เป็นต้น ยิ่งการใช้ประโยชน์จากปลาชนิดนี้เพิ่มขึ้นมาเท่าใดก็ยิ่งก่อให้เกิดของเสียที่เป็นกระดูกมากเท่านั้น

ดังนั้นการศึกษานำผงกระดูกปลาไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นสารเติมแต่งผลิตภัณฑ์อาหารหรือแม้แต่เพิ่มคุณค่าทางอาหารควรได้รับการศึกษา เพราะจะก่อให้เกิดแนวทางในการเปลี่ยนวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปปลาให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มมากยิ่งขึ้น การศึกษาดังกล่าวนอกจากจะเป็นแนวทางในการจัดการของเสียจากการแปรรูปปลาเกล็ดเงินที่เกิดขึ้นภายในประเทศแล้วจึงเป็นแบบจำลอง (Model) ที่ใช้สำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปปลาชนิดนี้ในอื่นๆ ได้อีกด้วยและนำมาซึ่งแนวทางในการลดของเสียจากอุตสาหกรรมตามหลักการจัดการให้ของเสียเป็นศูนย์ (Zero waste)

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ตอน โดยแต่ละตอนมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1.2.1 ตอนที่ 1 การประเมินคุณลักษณะของผงกระดูกปลาและการสกัดแคลเซียมจากกระดูกปลา

- 1.2.1.1 เพื่อศึกษาคุณลักษณะของผงกระดูกปลาที่ผ่านการกำจัดอินทรีย์สารด้วยการต้ม น้ำ และสารละลายต่างโดยใช้กระดูกปลาเกล็ดเงินและปลานิล
- 1.2.1.2 เพื่อศึกษาปริมาณแคลเซียมทั้งหมดและแคลเซียมละลายได้ในกระดูกปลาเกล็ดเงินและปลานิลที่ผ่านการบำบัดด้วยต่าง
- 1.2.1.3 เพื่อศึกษาการสกัดแคลเซียมจากกระดูกปลานิลด้วยสารละลายกรด

1.2.2 ตอนที่ 2 ผลของกระดูกปลาเกล็ดเงินต่อคุณภาพของไส้กรอกปลา

- 1.2.2.1 เพื่อประเมินศักยภาพของแคลเซียมละลายได้จากกระดูกปลาเกล็ดเงินในการกระตุ้นเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสเพื่อเร่งการเชื่อมข้ามโปรตีนกล้ามเนื้อปลา
- 1.2.2.2 เพื่อประเมินผลของผงกระดูกปลาเกล็ดเงินต่อคุณภาพของไส้กรอกปลาเกล็ดเงินด้านต่างๆ ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมี สี เนื้อสัมผัส และการประเมินทางประสาทสัมผัส

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 องค์ประกอบของกระดูกปลา

สารประกอบอินทรีย์ในกระดูกปลา โครงสร้างของกระดูกปลาประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีคอลลาเจน (Collagen) เป็นหลัก นอกจากนั้นก็เป็นสารจำพวกลิพิด (Lipid) และน้ำ คอลลาเจนที่พบในกระดูกปลามักเป็นชนิดที่ 1 (Type I collagen) ซึ่งคิดเป็นประมาณร้อยละ 20 ของมวลกระดูกหรือคิดเป็นร้อยละ 30 ของปริมาตรกระดูก นอกจากนั้นยังมีคอลลาเจนชนิดอื่นๆเป็นองค์ประกอบด้วยถึงแม้จะมีปริมาณน้อย คอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่พบในกระดูกและที่พบในผิวหนังมีความแตกต่างกันที่การจัดเรียงตัว (Arrangement) และการเชื่อมข้าม (Cross-linking) ของเส้นใยคอลลาเจนมากกว่าที่จะแตกต่างกันที่กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสายโปรตีนแอลฟาสามสายที่พันเกี่ยวกันเป็นรูปเกลียว (α -Helical chain) คอลลาเจนที่พบในปลามีทั้งแบบที่เป็นสายผสม (Heterotrimer) ระหว่าง $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ หรือ $(\alpha 1)_2\alpha 2$ หรือแม้กระทั่งสายเดี่ยวสามสาย (Homotrimer) ของ $(\alpha 1)_3$ โดยโปรตีนทั้งสามสายมีความแตกต่างกรดอะมิโนเพียงเล็กน้อย โดยที่ไกลซีน (Glycine) จะเป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดคิดเป็นหนึ่งในสามของกรดอะมิโนทั้งหมดในคอลลาเจน โดยลำดับของกรดอะมิโนที่มักพบคือ Gly-Pro-X และ Gly-X-HyP โดย X คือกรดอะมิโนใดๆก็ได้ ส่วน HyP คือ Hydroxyproline การที่คอลลาเจนมี Hydroxyproline อยู่มากทำให้โปรตีนชนิดนี้มีความคงตัวสูงและยากแก่การละลาย การมีไกลซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เล็กที่สุดอยู่ทุกๆ หน่วยที่ 3 ของหน่วยซ้ำซ้อน (Repeating unit) ทำให้ง่ายต่อการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างเกลียวของคอลลาเจน เส้นใยคอลลาเจนก็สามารถสร้างพันธะกันได้โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ นอกจากนั้นการเชื่อมข้ามเส้นใยดังกล่าวยังเกิดได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลและไขมัน

สารประกอบอนินทรีย์ในกระดูกปลา ได้แก่ ไบโอแอพพาไทท์ (Bioapatite) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของแร่ธาตุ โดยส่วนนี้จะทำหน้าที่หลักเป็นส่วนประกอบที่ให้ความแข็งแรงให้กับกระดูก นอกจากนั้นยังทำหน้าที่เชิงสรีรวิทยาโดยเป็นแหล่งของแร่ธาตุให้กับเซลล์ ไบโอแอพพาไทท์ อาจเรียกได้หลายอย่าง เช่น ไฮดรอกซีแอพพาไทท์ (Hydroxyapatite) ไฮดรอกซิล แอพพาไทท์ (Hydroxyl apatite) คาร์บอเนต แอพพาไทท์ (Carbonated apatite) หรือ ดาห์ไลต์ (Dahlite) สารประกอบอนินทรีย์ดังกล่าวมีลักษณะที่ค่อนข้างเป็นเอกลักษณ์ โดยมีโครงสร้างเป็นผลึก ขนาดประมาณ $50 \times 25 \times 5$ นาโนเมตร มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ค่อนข้างน้อยและมีความเป็นระเบียบในผลึก (Crystallinity) ค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามผลึกดังกล่าวมีบทบาทอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนาและการซ่อมแซมกระดูก มีรายงานว่า การจัดเรียงตัวของผลึกแอพพาไทท์ในกระดูกปลาและกระดูกคนมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่อย่างไรก็ตามขนาดของผลึกแอพพาไทท์มักจะมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับกลุ่มของสิ่งมีชีวิต ส่วนรูปร่างของผลึกแอพพาไทท์ในกระดูกได้ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ บางรายงานกล่าวว่าผลึกของแอพพาไทท์ในกระดูกเป็นรูปคล้ายเข็ม (Needle-like shape) แต่งานวิจัยส่วนใหญ่กลับบอกว่าผลึกในกระดูกมีรูปร่างคล้ายจาน (Plate-like shape) ธาตุอื่นๆ ก็อาจพบในกระดูกได้เช่นกัน แต่ส่วนมากมักจะเกิดจากการแทนที่หมู่คาร์บอเนตด้วยธาตุอื่นเช่น ฟอสเฟตหรือหมู่ไฮดรอกซิล ทำให้ในกระดูกมีปริมาณคาร์บอเนตคิดเป็นร้อยละประมาณ 5-6 เท่านั้น

สารประกอบอินทรีย์ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Vertebrate) มักจะมีไบโอแอพพาไทท์เป็นส่วนประกอบร้อยละประมาณ 66 โดยน้ำหนัก หรือ ร้อยละ 50 โดยปริมาตร แต่สำหรับกระดูกปลาอาจแตกต่างจากสัตว์มี

กระดูกสันหลังชนิดอื่นเนื่องจากพบร้อยละของไบโอแอพพาไทท์น้อยกว่า นอกจากนั้นยังพบว่าความหนาแน่นของกระดูกปลายังมีค่าน้อยกว่าอีกด้วย สัดส่วนของสารอินทรีย์ต่อสารอินทรีย์ และแรงยึดเหนี่ยว (Interactions) ระหว่างสารสองกลุ่มเป็นตัวกำหนดความแข็งแรงของกระดูก (Strength, Stiffness, Toughness) ความสัมพันธ์และการยึดเหนี่ยวกันระหว่างไบโอแอพพาไทท์และคอลลาเจนยังอยู่มีข้อถกเถียงกันอยู่ โดยบางงานวิจัยชี้ว่าผลึกของไบโอแอพพาไทท์จะอยู่ภายในเส้นใยของคอลลาเจนในขณะที่บางกลุ่มแสดงให้เห็นว่าผลึกดังกล่าวจะอยู่ด้านนอกของเส้นใยคอลลาเจน อย่างไรก็ตามแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสองส่วนถูกระบุว่าประกอบด้วยกลุ่มไฮดรอกซิล (OH-group) โดยคอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีหมู่ดังกล่าวอยู่มากเนื่องจากมีไฮดรอกซีโพรลีนมากในขณะที่ไบโอแอพพาไทท์มีหมู่ดังกล่าวค่อนข้างน้อย

องค์ประกอบทางเคมีของกระดูกปลาชนิดต่างๆได้รับการศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลในการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดย Toppe et al. (2007) ได้ศึกษาองค์ประกอบของกระดูกปลาชนิดต่างๆ ที่จับได้ในประเทศนอร์เวย์ โดยนำกระดูกกลางของและหัวของปลาชนิดต่างๆมาให้ความร้อนที่ 80-85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที่ จากนั้นกำจัดเนื้อติดก้างออกโดยการชะผ่านน้ำที่ไหลแรง นำกระดูกที่ได้ไปผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งและบดตัวอย่างที่ได้พร้อมกับร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบอย่างหยาบ (Proximate analysis) พบว่ากระดูกปลามีองค์ประกอบทั้งไขมันทั้งที่เป็นไขมันอย่างหยาบและไขมันทั้งหมด โปรตีน เกลือ ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (ตารางที่ 1) โดยปลาชนิดไขมันมาก (Fatty fish) ได้แก่ Salmon Trout Herring และ Mackerel มีปริมาณไขมันที่มากกว่าเนื่องจากปลาเหล่านี้จะกักเก็บไขมันไว้ในกล้ามเนื้อ ในขณะที่ปลาไขมันน้อย (Lean fish) ที่มักจะเก็บไขมันไว้ในตับพบว่ามีปริมาณไขมันน้อยกว่า นอกจากนั้นยังพบว่าปลาไขมันน้อยยังมีปริมาณโปรตีนและเกลือในกระดูกที่มากกว่าปลาไขมันมากด้วย

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของกระดูกปลาชนิดต่างๆ

ชนิดของปลา	องค์ประกอบ			
	ความชื้น	โปรตีน	เกลือ	ไขมัน
Cod	77.7±0.4	375.8±1.6	526.4±0.4	11.4±0.3
Saithe (ขนาดเล็ก)	61.9±2.4	369.7±2.2	538.2±7.4	14.1±2.0
Saithe (ขนาดใหญ่)	52.1±0.1	335.9±1.0	565±1.1	14.9±0.2
Blue whiting	64.1±0.1	418.0±0.1	445.8±0.3	49.1±0.7
Salmon	49.6±3.3	292.0±31.6	263.7±20.4	381.2±3.6
Trout	53.3±0.1	314.0±4.1	265.5±3.0	343.7±3.6
Herring (ขนาดเล็ก)	71.5±0.5	373.1±6.2	368.7±1.9	152.5±0.5
Herring (ขนาดใหญ่)	40.7±0.0	301.2±0.7	357.1±2.3	266.7±3.3
Mackerel	44.2±0.4	261.3±1.1	212.4±0.8	471.8±0.1
Horse mackerel	26.2±0.2	270.2±1.4	463.0±0.2	226.1±1.9

ที่มา: Toppe et al. (2007)

เมื่อนำกรดอะมิโนที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อเพื่อให้ทราบถึงชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนที่พบในกระดูกปลาชนิดต่างๆ พบกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิดในกระดูกปลาทุกชนิด (ตารางที่ 2) นอกจากนั้นยังพบกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของคอลลาเจน (Glycine, Proline, Hydroxyproline) อยู่ค่อนข้างมาก โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบระหว่างปลาใหญ่และปลาเล็กจะพบว่าปลาใหญ่มีแร่ธาตุมากกว่าปลาเล็กและมีกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของคอลลาเจนที่มากกว่า นอกจากนั้นปลาที่ได้จากการเลี้ยงในฟาร์มจะมีแบบแผนของกรดอะมิโนที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 แบบแผนของกรดอะมิโนที่พบในกระดูกปลาชนิดต่างๆ

อะมิโน	ชนิดปลา								
	Cod	Saithe (เล็ก)	Blue whiting	Salmon	Trout	Herring (เล็ก)	Herring (ใหญ่)	Mackerel	Horse Mackerel
Asp	77	74	88	78	78	82	70	78	66
Glu	112	110	126	112	112	115	103	110	103
Hypro	52	54	29	56	57	40	56	45	67
Ser	58	55	49	48	49	48	50	50	46
Gly	172	175	115	173	173	134	177	138	191
His	18	18	19	22	22	19	16	24	16
Arg	82	82	77	78	78	77	77	81	81
Thr	33	36	39	32	32	36	35	35	34
Ala	73	74	68	73	71	69	79	70	87
Pro	80	86	63	86	82	72	91	73	103
Tyr	20	22	31	19	18	27	17	23	15
Val	31	31	41	30	29	40	34	36	29
Met	24	23	30	26	26	29	25	24	22
Ile	22	22	33	22	22	27	20	27	20
Leu	43	40	59	41	39	52	44	51	40
Phe	25	26	35	26	26	34	29	31	26
Lys	42	41	61	44	43	50	44	52	43
Cys	20	17	12	14	12	12	55	13	72
Trp	4	4	8	4	4	7	6	6	5

ที่มา: Toppe et al. (2007)

นอกจากแบบแผนของกรดอะมิโนแล้วยังได้ทำการวิเคราะห์แร่ธาตุชนิดต่างๆที่เป็นองค์ประกอบในกระดูกปลาชนิดต่างๆ พบว่ากระดูกปลาทุกชนิดประกอบด้วยแคลเซียมและฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาเป็นธาตุแมกนีเซียม อย่างไรก็ตามแคลเซียมและฟอสฟอรัสพบว่ามีปริมาณน้อยในปลากลุ่ม Samonid อันได้แก่ Salmon และ Trout ซึ่งจัดเป็นปลาที่มีไขมันมาก โดยมีปริมาณแคลเซียมอยู่ระหว่าง 81-87 กรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ปลาไขมันน้อยจะมีปริมาณแคลเซียมมากกว่าโดยพบที่ค่าเฉลี่ย 186 กรัมต่อกิโลกรัม ส่วนปลาที่มีปริมาณแคลเซียมในกระดูกมากที่สุดคือ Mackerel โดยมี 233 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแร่ธาตุแต่ละชนิดในกระดูกปลาแสดงได้ดัง ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แร่ธาตุที่พบในกระดูกปลาชนิดต่างๆ

แร่ธาตุ	ชนิดปลา								
	Cod	Saithe (เล็ก)	Blue whiting	Salmon	Trout	Herring (เล็ก)	Herrin g (ใหญ่)	Mackerel	Horse Mackerel
Ca	190	199	170	135	147	161	197	143	233
P	113	108	87	81	87	94	95	86	111
Mg	3	3	3.2	2.2	2.4	2.6	2.9	2.6	3.6
Fe	49	44	135	32	32	61	72	73	56
Zn	98	70	72	233	126	191	124	125	70
Cu	1.0	1.2	3	0.9	0.9	2.6	0.8	2.2	0.5
Cr	10.8	9.8	16.9	5.5	6.7	3.6	2.4	3.9	5.5
Na	7.7	7.1	4.6	5.7	5.8	3.3	7.8	6.5	7.1
K	5.2	4.9	2.6	8.2	7.7	5	7.7	6.7	4.4
Se	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	0.3	ไม่พบ	ไม่พบ
I	3.7	2.6	1.4	2.7	2.5	1.2	3.6	2.2	2.1
Cl	4.8	4.1	1.9	4.4	4.2	1.4	4.5	4.1	4.0
F	0.19	0.17	0.07	0.1	0.09	0.03	ไม่พบ	0.26	ไม่พบ
As	ไม่พบ	0.3	0.6	1.0	1.2	1.0	3.8	2.4	2.7
Cd	0.01	0.02	0.13	ไม่พบ	0.02	0.03	0.06	0.06	0.03
Mg	0.01	0.01	0.04	0.02	0.01	0.03	0.02	0.03	0.02
Pb	ไม่พบ	0.07	0.12	ไม่พบ	ไม่พบ	0.26	0.09	0.24	0.11

ที่มา: Toppe et al. (2007)

2.2 การใช้ประโยชน์จากกระดูกปลา

การสกัดแอฟฟาไทท์จากกระดูกปลาเกิดขึ้นเนื่องจากการเล็งเห็นว่ากระดูกปลาเป็นวัสดุเหลือใช้ในอุตสาหกรรมประมงและการแปรรูปปลาหลายชนิด ดังนั้นการเก็บเกี่ยวเอากระดูกเหล่านั้นมาผลิตเป็นไบโอแอฟฟาไทท์จึงเป็นแนวทางในการลดของเสียอันเกิดจากอุตสาหกรรม นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้นำมาซึ่งการใช้ประโยชน์จากปลาอย่างเต็มประสิทธิภาพ กระบวนการดังกล่าวยังเป็นการส่งเสริมให้อุตสาหกรรมแปรรูปปลามีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่มุ่งเน้นการนำกระดูกปลามาสกัดและศึกษาคุณลักษณะของแอฟฟาไทท์เพื่อประโยชน์ในด้านต่างๆ

2.2.1 การใช้ประโยชน์เชิงการแพทย์

การสกัดและการศึกษาคุณสมบัติของแอฟฟาไทท์จากกระดูกปลาได้รับความสนใจเนื่องจากแอฟฟาไทท์ดังกล่าวซึ่งจัดเป็นสารประเภทเซรามิกและมีความใกล้เคียงกับกระดูกธรรมชาติโดยกระดูกและฟันของมนุษย์และมีค่าสัดส่วนระหว่างแคลเซียมกับฟอสฟอรัส (Ca:P) อยู่ที่ 1.67 เมื่อพิจารณาความหนาแน่นและความมีรูพรุนแล้วพบว่าแอฟฟาไทท์จากกระดูกปลาสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการผ่าตัดศัลยกรรมกระดูกและฟันได้เป็นอย่างดี โดยที่การปลูกถ่ายกระดูกด้วยวัสดุนั้นทำให้เกิดผลดีต่อกิจกรรมทางชีวเคมี (Bioavailability) การส่งผ่านพลังงาน (Osteoconductivity) และการส่งผ่านกระแสไฟฟ้า (Osteoinductivity) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยเกี่ยวกับการนำเอากระดูกปลาเป็นวัสดุในการผลิตแอฟฟาไทท์เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์

Boutinguiza et al. (2012) ได้นำกระดูกปลาทูน่า (Tuna) และปลาตาบ (Sword fish) มาผลิตแอพพาไทท์เชิงชีวภาพ (Biological apatite) โดยการให้ความร้อนสูง พบว่าเมื่อให้ความร้อนสูงที่ 600 องศาเซลเซียสทำให้ได้แอพพาไทท์ชนิด บี (B type apatite) และเมื่อให้ความร้อนเพิ่มเป็น 950 องศาเซลเซียสกลับพบว่าได้สารสองชนิดคือ Biological apatite และ Tricalciumphosphate ด้วยสัดส่วน 87:13 สารทั้งสองชนิดนี้สามารถนำไปใช้เป็นวัสดุในการปลูกถ่ายกระดูกและฟันได้ เมื่อนำสารที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค Cytotoxicity พบว่าสารดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างใด ดังนั้นการผลิตแอพพาไทท์จากของเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรมประมงจึงมีความเป็นไปได้และควรได้รับการศึกษาต่อไป

Piccirillo et al. (2013) ได้มีแนวความคิดในการเปลี่ยนวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมแปรรูปปลาคอด (Cod fish) เพื่อเป็นแหล่งในการผลิตไบโอแอพพาไทท์เพื่อประโยชน์ในการปลูกถ่ายกระดูก (bone implant) สำหรับมนุษย์ กระบวนการดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการเปลี่ยนของเสียจากอุตสาหกรรมเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น การศึกษาดังกล่าวได้ตัดแปรไบโอแอพพาไทท์จากกระดูกปลาคอดโดยการให้ความร้อนสูง (Calcination) ที่ 900 และ 1200 องศาเซลเซียส กระบวนการดังกล่าวทำให้ได้ไฮดรอกซีแอพพาไทท์ (biphasic hydroxyapatite) และไตรแคลเซียมคาร์บอเนต (Tricalcium carbonate) ด้วยสัดส่วนโมล 75 ต่อ 25 โดยวัสดุดังกล่าวถูกใช้ในการปลูกถ่ายกระดูกอยู่แล้ว นอกจากนั้นการให้ความร้อนควบคู่กับการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) และโซเดียมฟลูออไรด์ (NaF) ทำให้ได้คลอแรพพาไทท์ (Chlorapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$) และฟลูออแรพพาไทท์ (Fluorapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) ตามลำดับ การให้ความร้อนควบคู่กับสารที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบก็เพื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบในกระดูกปลาให้ได้สัดส่วนระหว่างแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการปลูกถ่ายกระดูก เนื่องไบโอแอพพาไทท์ในกระดูกมนุษย์จะมีแคลเซียมต่ำ (Ca deficiency) โดยสัดส่วน Ca:P น้อยกว่า 1.67 หรือบางครั้งอาจใกล้เคียงกับ 1.5

ผลจากการศึกษาพบว่าไบโอแอพพาไทท์ที่ได้จากกระดูกปลาคอดและอนุพันธ์ของแอพพาไทท์มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการปลูกถ่ายกระดูกโดยการประเมินคุณสมบัติเหล่านั้นใช้เทคนิคด้านการสะท้อนรังสีเอกซ์ (X-ray diffraction) อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy) กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscopy) นำมาซึ่งแนวทางในการประยุกต์ใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเพื่อพัฒนาการทางการแพทย์

2.2.2 การใช้ดูดซับโลหะหนัก

นอกจากการศึกษาแอพพาไทท์จากกระดูกปลาเพื่อการแพทย์แล้วยังมีการศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้กระดูกปลาในการบำบัดของเสียจากอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอุตสาหกรรมหนักที่มีโลหะหนักเจือปนออกมา โดยหนึ่งในหลักการกำจัดคือการดูดซับด้วยตัวดูดซับที่เหมาะสมเป็นวิธีการที่นิยมเนื่องจากกำจัดโลหะหนักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้นทุนต่ำ และการปฏิบัติมีวิธีการที่ค่อนข้างง่าย ตัวดูดซับที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันคือถ่านดูดซับ (Activated carbon) แต่วัสดุดังกล่าวก็มีข้อจำกัดคือราคาแพง ดังนั้นการค้นหาวัสดุดูดซับที่มีราคาต่ำจึงควรได้รับการศึกษาและวัสดุที่ได้รับความสนใจก็มี แกลบ ใบชาแก่ เยื่อไม้ ช้างข้าวโพด เป็นต้น นอกจากวัสดุดังกล่าวแล้วกระดูกปลาก็เป็นตัวเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากโครงสร้างประกอบด้วยแคลเซียมแอพพาไทท์ที่มีความสามารถในการดูดซับโดยแรงดึงดูดทางไอออนสูง นอกจากนั้นยังมีการสร้างสารประกอบกับฟอสเฟตที่พื้นผิว สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นใหม่สามารถถูกตกตะกอนและแยกตัวออกจากสารละลายได้ ดังนั้นความเป็นไปได้ในการใช้กระดูกเพื่อดูดซับโลหะหนักจึงได้รับการศึกษา

Lim et al. (2012) ได้นำกระดูกปลาที่เหลือจากการชำแหละเนื้อขายจากตลาดท้องถิ่นในเมือง Bukit Mertajam, Penang, Malasia มาต้มด้วยน้ำเดือดเพื่อกำจัดเศษเนื้อออกจากนั้นนำกระดูกที่ได้ไปอบแห้งที่ 80

องศาเซลเซียสและบดเป็นผง นำผงที่ได้ไปผสมกับสารละลายต่าง (NaOH 0.1 โมลาร์) และเขย่าที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นก็กรองเอาผงกระดูกที่ได้และอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นก็นำผงที่ได้ไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาดระหว่าง 125 – 250 ไมโครเมตร นำกระดูกดังกล่าวไปศึกษาคุณลักษณะโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ผลจากการศึกษาพบว่ากระดูกที่ได้มีความเป็นรูพรุนค่อนข้างมากจึงมีความเป็นไปได้ที่ไอออนของสังกะสีจะถูกดูดซับบนพื้นผิวของอนุภาคกระดูกได้ดี นอกจากนั้น การศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีพบสัญญาณการสั่นของพันธะระหว่าง N-H stretch ที่หมายเลขคลื่น 3,423.98 พันธะ C-H stretch ที่ 2,922.50 พันธะ C=O stretch ที่ 1663.32 และ N=O stretch ที่ 1,458.02 นอกจากนั้นยังมีพันธะ C-O-C stretch ที่ 1,027.56 และ C-C stretch ที่ 827.57 ด้วย สัญญาณดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าองค์ประกอบหลักของกระดูกคือไฮดรอกซีแอพพาไทท์ จากนั้นยัง ศึกษาพฤติกรรมการดูดซับกับสารละลายสังกะสีไนเตรต ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) เพื่อให้ผงกระดูกดูดไอออนของสังกะสีโดยศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่างพบว่าผงกระดูกดังกล่าวจะดูดซับสังกะสีไอออนได้ดีตั้งแต่ค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 6 เป็นต้นไป ผลของเวลาในการดูดซับพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2 ชั่วโมงการดูดซับเริ่มเข้าสู่การอิ่มตัว ส่วนผลของความเข้มข้นพบว่าพฤติกรรมการดูดซับเป็นแบบ Psedo-second-order ดังนั้นการใช้ผงกระดูกปลาเป็นสารดูดซับสังกะสีไอออนจึงมีความเป็นไปได้หากพิจารณาใช้ที่ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณผงกระดูก และเวลาที่เหมาะสม

นอกจากสังกะสีแล้วยังมีการศึกษาผลของผงกระดูกปลาต่อการดูดซับไอออนของทองแดง (Cu^{2+}) อีกด้วย โดย Kizilkaya et al. (2010) ได้นำกระดูกปลาชนิดต่างๆ ที่พบในแถบยุโรปได้แก่ European anchovy จำนวนสองสายพันธุ์ คือ *Engraulis encrasicolus* และ *Sardine pilchardus* ปลา Bogue ปลา Blue fish และ Gilthead seabream มาใช้เป็นสารดูดซับเพื่อกำจัดไอออนของทองแดงออกจากสารละลาย โดยศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่าง เวลา ความเข้มข้นเริ่มต้นของไอออน อุณหภูมิ ชนิดของปลา และปริมาณของผงกระดูกต่อประสิทธิภาพในการกำจัดไอออนของทองแดง ผลจากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง 5 และกระดูกจากปลา Bogue มีความสามารถในการดูดซับได้ดีที่สุด ความจุของการดูดซับ (Adsorption capacity) มีค่า 150.7 มิลลิกรัมต่อกรัมของกระดูกที่สภาวะที่เหมาะสมที่สุด พฤติกรรมการดูดซับก็เป็นแบบ Psedo-second-order และกลไกในการดูดซับเป็นแบบดูดความร้อน (Endothermic adsorption) และที่สำคัญคือผงกระดูกดังกล่าวมีศักยภาพในการเป็นตัวดูดซับไอออนของทองแดงได้เป็นอย่างดี

2.2.3 การใช้เป็นอาหารสัตว์

กระดูกปลาเป็นวัสดุที่ประกอบด้วยแคลเซียมและฟอสฟอรัสซึ่งจัดเป็นแร่ธาตุที่มีความจำเป็นสำหรับพัฒนาการของกระดูกและฟันสำหรับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ดังนั้นการนำกระดูกปลาเพื่อมาเป็นอาหารสัตว์ทั้งสัตว์บกและสัตว์น้ำก็ได้รับการศึกษาไม่น้อยเช่นกัน การศึกษาดังกล่าวนำมาซึ่งการใช้ประโยชน์จากของเสียในอุตสาหกรรมประมงอย่างเป็นรูปธรรมดังจะเห็นได้จากของเสียจากอุตสาหกรรมดังกล่าวถูกจำหน่ายเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารสัตว์ไม่ว่าจะเป็นอาหารปลาหรืออาหารสำหรับสุกร

Wei et al. (2004) ได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำกระดูกป่น (Bone meal) มาเป็นส่วนผสมสำหรับผลิตอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยเปรียบเทียบกับกระดูกไก่ป่น (Poultry meal) โดยทำการทดแทนกระดูกปลาป่นและกระดูกไก่ป่นที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 20 40 60 และ 80 ของปลาป่นในสูตร โดยควบคุมปริมาณไนโตรเจนและพลังงานจากทุกสูตรอาหารที่เท่ากัน ผลจากการศึกษาพบว่าความสามารถในการย่อย (Digestibility) และประสิทธิภาพการเติบโต (Growth

performance) ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหารเมื่อปลาปนูกทดแทนที่ร้อยละ 0-60 หากแต่น้ำหนักตัวปลา ความยาวตัวปลา และความสามารถในการย่อยจะลดลงเมื่อถูกทดแทนที่ร้อยละ 80 แต่การทดแทนด้วยกระดูกไก่ป่นถึงร้อยละ 80 ไม่กระทบต่อประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของลูกกุ้งแต่อย่างใด

ปี 2012 Suloma et al. (2012) ได้ศึกษาถึงศักยภาพของการใช้เนื้อติดกระดูกป่น (Meat and bone meal) ในการผลิตอาหารที่มีพืชเป็นองค์ประกอบหลัก (Plant-based diet) สำหรับปลานิล เนื่องจากอาหารดังกล่าวจะมีปริมาณฟอสฟอรัสค่อนข้างน้อย โดยแปรปริมาณการทดแทนกระดูกป่นที่ระดับต่างๆ กล่าวคือ ร้อยละ 56 67 และ 78 และนำไปเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลจากการศึกษาพบว่าน้ำหนักตัวปลา อัตราการเจริญเฉพาะ (Specific growth rate) การเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (Feed conversion ratio) ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวปลา (Whole body P concentration) การเก็บกักโปรตีน (Protein retention) และฟอสฟอรัสที่ถูกกักเก็บ (Retained P) มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมผงกระดูกติดเนื้อป่นในปริมาณเพิ่มขึ้นโดยการเติมที่ร้อยละ 78 ทำให้ค่าดังกล่าวสูงที่สุด ผลจากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การเพิ่มขึ้นพบว่า เป็นไปแบบเส้นตรง (Linear regression) ดังนั้นการเติมเนื้อและกระดูกป่นเป็นแหล่งของแร่ธาตุฟอสฟอรัสให้กับปลานิลได้เป็นอย่างดี

นอกจากสัตว์น้ำแล้วสัตว์บกก็ได้รับการศึกษาถึงผลของการใช้กระดูกปลาในสูตรอาหารเพื่อเป็นแหล่งของแคลเซียมโดยเฉพาะการศึกษาในสุกรโดย Malde et al. (2009) ศึกษาการการเติมกระดูกจากปลา Salmon ปลา Saith และปลา Cod โดยกระดูกปลาดังกล่าวถูกนำมาผ่านกระบวนการกำจัดเนื้อโดยการต้มและการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสก่อนทำให้แห้งและบดเป็นผง จากนั้นผงดังกล่าวถูกนำมาเสริมในอาหารสำหรับเลี้ยงสุกรเพื่อประเมินความสามารถในการดูดซับแคลเซียมจากอาหารแต่ละสูตรเปรียบเทียบกับสูตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตผลจากการศึกษาพบว่าลูกหมูที่ได้รับอาหารสูตรที่เติมผงกระดูกป่นที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มีอัตราการดูดซึมแคลเซียมได้ดีกว่าลูกหมูกลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรเติมผงกระดูกป่นที่ผ่านการต้มน้ำและแคลเซียมคาร์บอเนต ผลจากการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ากระดูกปลาน่าจะมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของแคลเซียมธรรมชาติ (Natural calcium) ในอาหารสัตว์หรือแม้กระทั่งอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับมนุษย์ได้ด้วย

2.2.4 การใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

การศึกษาศึกษาเพื่อนำกระดูกปลาเป็นแหล่งแคลเซียมสำหรับมนุษย์ก็ได้รับการศึกษาในลำดับถัดมาเพราะกระดูกปลาเป็นทั้งแหล่งของแคลเซียมและฟอสฟอรัส โดยปกติคนเรามากได้รับแร่ธาตุเหล่านี้จากการดื่มนม แต่สำหรับผู้บริโภคบางกลุ่มที่เข้าถึงนมและผลิตภัณฑ์นมได้ยากก็อาจก่อให้เกิดการขาดแร่ธาตุแคลเซียมได้ ความพยายามในการพัฒนากระดูกปลานิลให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมก็ได้รับการศึกษาโดย Techochatchawal et al. (2009) โดยกระดูกปลานิลได้ถูกต้มกับน้ำเป็นเวลา 10 นาทีที่ 95 องศาเซลเซียส จากนั้นแช่ในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายต่าง (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้สัดส่วนของกระดูกต่อสารละลายต่างเป็น 1:5 จากนั้นล้างกระดูกดังกล่าวด้วยการปล่อยให้น้ำเปล่าเป็นเวลา 5 ครั้ง จากนั้นกระดูกจะถูกนำเข้าหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที จากนั้นกระดูกจะถูกนำไปอบแห้งที่ 50 70 และ 90 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการประเมินคุณภาพด้านต่างๆ เช่น สีของผงกระดูก ความเป็นรุกรุน ความชื้น และปริมาณแคลเซียม นอกจากนั้นปริมาณโลหะหนักที่อาจก่ออันตรายก็ได้รับการตรวจวัดปริมาณ เช่น ปริมาณตะกั่วและอาร์ซีนิก (Arsenic) ตลอดจนปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Clostridium* spp. *Escherichia coli* *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ผล

จากการศึกษาพบว่า การแช่กระดุกในสารละลายต่างจะทำให้ได้ผงกระดุกที่มีความขาวและความสว่างมากกว่า การต้มในคลอรีนและน้ำเปล่า การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ค่าความสว่างของผงกระดุกลดลงถึงแม้ว่าจะทำให้สามารถลดระยะเวลาในการทำแห้งลงได้มากก็ตาม กระบวนการดังกล่าวทำให้ได้ผงกระดุกที่มีปริมาณแคลเซียมร้อยละประมาณ 24.09-25.18 จากผลการศึกษาพบว่า การให้ความร้อนกระดุกที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 90 นาที ตามด้วยการทำให้แห้งที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตผงกระดุกจากปลานิลเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมเกลือแร่ประเภทแคลเซียมธรรมชาติ ผลจากการประเมินคุณภาพพบว่าผงกระดุกที่ได้มีมาตรฐานเป็นไปตามเกณฑ์ของกระทรวงสาธารณสุข ดังแสดงรายละเอียดได้ใน ตารางที่ 3 นอกจากนี้ปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคร้อยอยู่ในมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับดังข้อมูลใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของกระดุกและอาหารเสริมแคลเซียม

คุณลักษณะ	ปริมาณ	
	มาตรฐานอาหารเสริม	ผงกระดุกปลานิล
ปริมาณอาร์ซินิกทั้งหมด	≤ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	0.36 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
ตะกั่ว	≤ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	0.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
แคลเซียมทั้งหมด	120-800 มิลลิกรัมต่อแคปซูล	150 มิลลิกรัมต่อแคปซูล

ที่มา: Techochatchawal et al. (2009)

ตารางที่ 5 จุลินทรีย์ในผงกระดุกปลานิลเทียบกับมาตรฐานอาหารเสริมแคลเซียม

ชนิดของจุลินทรีย์	ปริมาณ	
	มาตรฐานอาหารเสริม	ผงกระดุกปลานิล
<i>Clostridium</i> spp.	ไม่พบใน 0.1 กรัม	ไม่พบใน 0.1 กรัม
<i>Escherichia coli</i>	< 3 MPN ต่อกรัม	< 3 MPN ต่อกรัม
<i>Salmonella</i> spp.	ไม่พบใน 25 กรัม	ไม่พบใน 25 กรัม
<i>Staphylococcus aureus</i>	ไม่พบใน 0.1 กรัม	ไม่พบใน 0.1 กรัม

ที่มา: Techochatchawal et al. (2009)

จากการศึกษาดังกล่าวนำมาซึ่งข้อสรุปที่ว่า การผลิตผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมจากกระดุกปลานิลสามารถทำได้โดยการแช่กระดุกปลานิลในสารละลายต่างด้วยอัตราส่วน 1:5 เป็นเวลา 90 นาที ก่อนนำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 90 นาที และทำแห้งกระดุกที่ได้โดยการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กระดุกที่จะต้องนำไปบดเป็นผงให้มีขนาดน้อยกว่า 150 ไมโครเมตร ก่อนบรรจุในแคปซูลขนาด 600 มิลลิกรัม โดย 1 แคปซูลจะมีปริมาณแคลเซียมร้อยละ 25.01 และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็เป็นไปตามมาตรฐานของรัฐบาลไทย

นอกจากนี้ การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของผงกระดุกปลาเพื่อเป็นแหล่งของอาหารเสริมแคลเซียมยังได้รับการเปรียบเทียบกับกระดุกโกโดย Phiraphinyo et al. (2006) ซึ่งได้นำกระดุกปลา Giant seaperch (*Lates calcarifer* Bloch) กับปลา Hoki (*Macrurus novaezelandiae*) มาสับเป็นชิ้นเล็กและแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5 ภายใต้สภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองเอาเฉพาะกระดุกและล้างน้ำก่อนนำกระดุกที่ได้ไปอบ 60 องศาเซลเซียส นานหนึ่งวัน บดตัวอย่างที่ได้ให้มีขนาด

เล็กและร้อนผ่านตะแกรงเบอร์ 60 ลักษณะปรากฏของกระดูกก่อนและหลังอบได้รับการสังเกตและถูกพบว่าเมื่อผ่านการอบตัวอย่างจะมีสีเข้มขึ้นและค่าความสว่างหรือความขาวจะลดลง การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมซึ่งทำโดยด้วยวิธี Complexotitration พบว่ากระดูกไก่และปลา Hoki มีค่าใกล้เคียงกันที่ประมาณร้อยละ 31.8 และ 32.2 ตามลำดับ ส่วนปลา Sea perch พบว่ามีแคลเซียมน้อยที่สุดคือร้อยละ 28.1 ปริมาณอาร์ซินิคถูกพบว่ามีค่าน้อยกว่าร้อยละ 3 ส่วนโลหะหนักอื่นๆ พบว่ามีค่าน้อยกว่าร้อยละ 0.002 จากนั้นทำการเปรียบเทียบคุณลักษณะของผงกระดูกที่ได้กับแคลเซียมคาร์บอเนตพบว่าผงกระดูกปลาและไก่มีศักยภาพในการเป็นแหล่งของแคลเซียมธรรมชาติสำหรับมนุษย์ได้

2.3 ผงกระดูกปลาและคุณค่าทางโภชนาการ

แม้กระดูกปลาจะได้ขึ้นชื่อว่าเป็นแหล่งของแคลเซียมธรรมชาติและสามารถผลิตเป็นผงที่มีปริมาณแคลเซียมได้ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำพวกแร่ธาตุแคลเซียมก็ตาม แต่การบริโภคผงกระดูกโดยตรงแล้วก่อให้เกิดการนำไปใช้ประโยชน์ต่อร่างกายก็ได้อีกทั้งคำถาม และมีหลายงานวิจัยที่พยายามพิสูจน์ข้อเท็จจริงดังกล่าวทั้งในแบบจำลองของหนูทดลองและของมนุษย์ ทั้งนี้เพื่อนเน้นการประเมินความสามารถในการก่อประโยชน์เชิงชีวเคมี (Bioavailability) ของกระดูกปลา

Xu (1996) ได้ประเมินศักยภาพของผงกระดูกจากปลา Black carp ต่อปริมาณแคลเซียมในเลือดและความสามารถในการรักษาโรคกระดูกในระบบสิ่งมีชีวิต (*In vitro*) โดยใช้หนูทดลอง ผลจากการศึกษาพบว่าแคลเซียมที่เตรียมได้จากกระดูกปลาสามารถถูกดูดซึมได้เป็นอย่างดีและสามารถนำแคลเซียมไปใช้ประโยชน์ได้

ปี ค.ศ. 2009 (Luu and Nguyen, 2009) ได้มีนักวิจัยเตรียมผงกระดูกจากปลา Catfish ปลา Salmon และปลา Snapper โดยการให้ความร้อนกระดูกในสารละลายต่าง (NaOH, 3%) ด้วยสัดส่วนกระดูกต่อต่าง 1:4 เป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นนำไปล้างในสารละลายกรด (HCl, 1%) เพื่อทำให้เป็นกลางและนำกระดูกที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง กระดูกแห้งที่ได้ถูกนำไปบดเป็นผงและร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตรก่อนนำไปเติมในขนมปังโดยเปรียบเทียบกับสารเติมแต่งที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบได้แก่ บีตาไฮดรอกซีแคลเซียมฟอสเฟต แคลเซียมซิเตรต โดยเสริมเข้าไปในสูตรของขนมปังที่ร้อยละ 1.5 จากนั้นประเมินคุณภาพขนมปังด้านองค์ประกอบเคมี ผลจากการศึกษาพบว่ากระดูกปลาในขนมปังส่งผลให้ปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้นจากตัวอย่างควบคุมเกือบ 5 เท่า โดยการเติมสารเติมแต่งที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบทำให้แคลเซียมในขนมปังเพิ่มมากขึ้นกว่าการไม่เติมกระดูกปลา ความสามารถในการปลดปล่อยแคลเซียมจากขนมปังเมื่อผ่านกระบวนการย่อยจำลอง (*In vitro* digestion) ได้ถูกตรวจสอบโดยการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ตามด้วยสารสกัดจากน้ำดี (Bile extract) จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยไปทำการกำจัดไอออนออกโดยการทำไดอะไลซิส (Dialysis) ผ่านเยื่อเลือกผ่านที่มีขนาดเลือกผ่าน (Molecular cut off) ที่ 12,000 ดาลตัน จากนั้นประเมิน Bioavailability โดยคิดจากสัดส่วนแคลเซียมที่ซึมผ่านออกมานอกเยื่อเลือกผ่านต่อแคลเซียมทั้งหมดในตัวอย่าง พบว่าแคลเซียมที่ลอดผ่านเยื่อเลือกผ่านสำหรับตัวอย่างที่เติมกระดูกปลามีค่าร้อยละ 35.21 ในขณะที่ตัวอย่างที่เติมแคลเซียมซิเตรตพบว่ามีค่าร้อยละ 31.13 ทั้งๆที่แคลเซียมในตัวอย่างขนมปังที่เติมแคลเซียมซิเตรตมีค่ามากกว่าขนมปังที่เติมกระดูกปลา (ร้อยละ 507.01 และ 443.91 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ) ผลจากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมที่อยู่ในกระดูกสามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารได้ในระดับใกล้เคียงหรืออาจจะมากกว่าสารเติมแต่งแคลเซียมเสียด้วยซ้ำ เมื่อแคลเซียมจากกระดูกถูกย่อยและกลายเป็นแคลเซียมที่ละลาย (Soluble calcium) ก็มีแนวโน้มว่าจะถูกดูดซึมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนากระดูก

ในปีถัดมา Malde et al. (2010) ได้ศึกษา Bioavailability ของกระดูกปลา Atlantic salmon ซึ่งจัดเป็นปลาไขมันสูง (Oily fish) เปรียบเทียบกับปลา Atlantic cod ซึ่งจัดเป็นปลาไขมันต่ำ (Lean fish) โดยใช้หน่วยทดลองเป็นชายสุขภาพดีจำนวน 10 คน จากนั้นได้ทำการตรวจวัดปริมาณ ^{47}Ca ภายหลังการย่อยอาหาร โดยการทดลองได้เปรียบเทียบกับแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวควบคุมด้วย ผลจากการศึกษาพบว่า ปริมาณการดูดซึมแคลเซียมจากผงกระดูกปลา Salmon ปลา Cod และแคลเซียมคาร์บอเนตมีค่าร้อยละ 21.9 ± 1.7 22.5 ± 1.7 และ 27.4 ± 1.8 ถึงแม้ว่าการดูดซึมแคลเซียมของชายทดลองที่ได้รับผงกระดูกปลาจะมีค่าน้อยกว่าแคลเซียมคาร์บอเนตแต่ผลการทดลองดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าการบริโภคผงกระดูกปลาทำให้ปริมาณการดูดซึมแคลเซียมในร่างกายของคนเราเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยอัตราการดูดซึมแคลเซียมในรูปแบบของเกลือของร่างกายคนเราถูกรายงานว่าอยู่ในช่วงร้อยละ 23-27 นอกจากนั้นการดูดซึมแคลเซียมจะเกิดขึ้นได้ดีก็ต่อเมื่อได้รับแคลเซียมพร้อมๆกับการรับประทานอาหาร นอกจากนั้นยังให้คำแนะนำสำหรับการศึกษาต่อไปว่าการจะนำกระดูกปลาเป็นแหล่งแคลเซียมธรรมชาติสำหรับคนเราควรมีกระบวนการทำให้กระดูกอ่อนนุ่ม (Bone softening method) กระบวนการดังกล่าวทำได้โดยการให้ความร้อนและการใช้กรด นอกจากนั้นการให้เวลาในการทำให้สุกที่นานก็มีส่วนช่วยเช่นเดียวกัน โดยการทำให้สุกนานๆจะทำให้กระดูกนุ่มได้เนื่องจากการชะเอาโปรตีนขนาดเล็กที่พื้นผิวของกระดูกออกไปกับน้ำทำให้เนื้อสัมผัสของกระดูกเปลี่ยนไป ดังนั้นการทำให้อาหารสุกนานๆจะช่วยทำให้ร่างกายได้รับแคลเซียมเพิ่มขึ้นทำให้เพิ่มความสามารถในการดูดซึมของแคลเซียมได้ดีขึ้น

2.4 การใช้ผงกระดูกปลาปรับปรุงคุณภาพโปรตีนเจลาจากปลา

นอกจากการศึกษาบทบาทของแคลเซียมในกระดูกปลาต่อคุณค่าทางอาหารแล้ว การใช้ประโยชน์จากแคลเซียมในกระดูกปลาเพื่อปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนเจลาจากปลาก็ได้รับการศึกษาทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการนำวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมแปรรูปปลามาปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลานำมาซึ่งการจัดการของเสียที่มีประสิทธิภาพและลดต้นทุนการนำเข้าแคลเซียมสังเคราะห์ด้วย

Kim et al. (1998) ได้ศึกษาผลของกระดูกปลา Alaska Pollock ในซูริมิที่ผลิตจากปลา Mackerel และตรวจประเมินคุณภาพด้านต่างๆ พบว่าปริมาณแคลเซียมทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากเดิม 7.0 เป็น 270.05 และปริมาณแคลเซียมละลายได้เพิ่มขึ้นจาก 2.9 เป็น 105.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อมีการเติมผงกระดูกปลาลงไปร้อยละ 0.9 เนื้อสัมผัสของเจลาจากซูริมิได้รับการปรับปรุงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 0.9 นอกจากนั้นการมีผงกระดูกช่วยลดอัตราการผลิตฮิสตามีน (Histamine) ในตัวอย่างได้ด้วย อย่างไรก็ตามความแข็งแรงของเจลากลับมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการเติมผงกระดูกปลา

เมื่อเร็วๆนี้ Yin et al. (2014) ได้ศึกษาผลของการเติมผงกระดูกปลาในผลิตภัณฑ์โปรตีนเจลาจากเนื้อปลาบดที่ผ่านการล้างน้ำและแช่เยือกแข็ง (Surimi) โดยเปรียบเทียบผลของกระดูกในระดับนาโนเมตรและไมโครเมตร โดยใช้กระดูกจากปลา Pacific whiting กระบวนการผลิตผงกระดูกเริ่มจากแช่กระดูกในสารละลายด่างที่มีค่า pH 12 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างน้ำและกำจัดเศษเนื้อออกแล้วนำกระดูกที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อน 105 องศาเซลเซียสจนแห้งสนิท กระดูกที่ได้ถูกนำไปบดด้วยเครื่องบดและร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด 150 ไมโครเมตร จากนั้นผงกระดูกดังกล่าวได้ถูกนำไปบดด้วยกระบวนการโม่เปียก (Wet milling) 2 ขั้นตอนทำให้ได้กระดูกที่มีขนาดเล็กลงในระดับนาโนเมตร ทำการประเมินปริมาณแคลเซียมจากผงกระดูกด้วยหลักการ Inductively coupled plasma-optical spectrometry จากนั้นนำกระดูกที่ได้ทั้งสองขนาดไปผสมกับ Surimi ที่ผลิตจากปลา Alaska Pollock ในสถานะที่มีเกลือร้อยละ 2 ตามกระบวนการทำให้เป็นเจลา โดยได้แปรความเข้มข้นของผงกระดูกทั้งสองขนาดในตัวอย่างตั้งแต่ร้อยละ 0 0.1 0.25 0.5 1 และ 2 จากนั้น

นำตัวอย่างไปอัดในไส้ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร นำตัวอย่างไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่าการเซ็ทตัวอย่าง (Setting process) แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นประเมินเนื้อสัมผัสของเจลที่ได้ พบว่าการเติมผงกระดูกที่มีขนาดเล็ก กระดาษนาโนเมตรทำให้ค่าแรงที่ทำให้เจลแตกและระยะทางที่ทำให้เจลแตกเพิ่มมากขึ้นในขณะที่การเติมผงกระดูกระดับไมโครเมตรไม่ส่งผลใดๆเลย การที่ค่าแรงและระยะทางดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นสะท้อนให้เห็นว่าเนื้อสัมผัสของเจลได้รับการปรับปรุง และเมื่อประเมินเทียบกับการรับรู้ทางประสาทสัมผัสจะทำให้ได้เนื้อสัมผัสที่มีความยืดหยุ่นซึ่งเป็นคุณลักษณะที่สำคัญสำหรับผลิตภัณฑ์เจลจากโปรตีนและเป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดลำดับคุณภาพของซูริมิ นอกจากนี้การเติมกระดูกขนาดนาโนเมตรยังช่วยเพิ่มความขาวและความสว่างให้กับเจลอีกด้วย เมื่อพิจารณาภาพถ่ายพื้นผิวของเจลพบว่ากระดูกระดับนาโนเมตรสามารถรวมตัวกันกับเจลได้เป็นอย่างดี โดยไม่ทำให้ความต่อเนื่องของเส้นใยเจล (Fibrillar gel) ขาดหายไป ดังนั้นการเติมผงกระดูกในระดับนาโนเมตรจึงน่าจะเป็นแนวทางในการเพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์เจลจากเนื้อปลาด้วยวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมแปรรูปปลา

ในปีเดียวกันนี้ การทดลองที่เป็นการยืนยันประสิทธิภาพของผงกระดูกที่มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตรต่อคุณภาพของเจลจากซูริมิกได้รับการประเมินอีกครั้งโดยศึกษาตั้งแต่ผลของผงกระดูกต่อพฤติกรรมของโปรตีนในซูริมิจากปลา Alaska Pollock ด้วยเครื่องวัดการเปลี่ยนแปลงทางวิทยากระแส (Rheological measurement) ผลจากการศึกษาพบว่ากระดูกระดับนาโนเมตรทำให้แรงกระบวนการเกิดเจลอันจะเห็นได้จากค่าความเป็นเจล (G') ของตัวอย่างมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของผงกระดูกในตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างที่เป็นเจลอย่างสมบูรณ์ไปพิสูจน์การเชื่อมข้ามของโปรตีนทำให้ทราบว่าโปรตีนโดยเฉพาะไมโอซิน (Myosin) ได้ถูกเชื่อมข้ามด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bonding) โดยพันธะดังกล่าวไม่สามารถถูกทำลายได้ด้วยสารรีดิวซ์ (Reducing agent) จึงไม่น่าจะเป็นพันธะโควาเลนต์แบบไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) อย่างไรก็ตามพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นได้ถูกสันนิษฐานว่าเป็นพันธะไอโซเปปไทด์ (Isopeptide) ที่เกิดจากการเชื่อมกันระหว่างโปรตีนที่กลูตามีนกับโปรตีนที่มีไลซีนเป็นองค์ประกอบ การเชื่อมข้ามดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้จากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ซึ่งได้รับการค้นพบโดย Ando et al. (1996) นำมาซึ่งการผลิตเป็นเอนไซม์เชิงการค้า (Commercial enzyme) เอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำงานได้โดยไม่ต้องใช้ออกซิเจนใดเลยทำให้ง่ายต่อการประยุกต์ใช้และเอนไซม์ชนิดนี้ยังถูกใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนเจลจากเนื้อปลาในกรณีที่โปรตีนที่นำมาผลิตเจลมีคุณภาพต่ำ อย่างไรก็ตามการพึ่งพาเอนไซม์ทางการค้าถึงแม้จะส่งผลดีต่อผลิตภัณฑ์แต่ก็ส่งผลเสียเพราะจะทำให้เกิดความเสียเปรียบในการแข่งขันทางการค้า ดังนั้นการหาเอนไซม์ทางเลือกเพื่อปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากโปรตีนเจลจึงน่าจะเป็นทางออก

เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อปลาอยู่แล้ว และมีงานวิจัยศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในกล้ามเนื้อปลาทูน่า โดยเอนไซม์ดังกล่าวพบว่ามีความต้องการแคลเซียมในการกระตุ้นการทำงาน ดังนั้นหากเราสามารถกระตุ้นให้เอนไซม์ในกล้ามเนื้อปลาทูน่าทำงานได้เต็มประสิทธิภาพก็จะทำให้ไม่จำเป็นต้องเติมเอนไซม์จากภายนอก ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่พบว่ากระดูกเติมแคลเซียมในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสได้ดังนั้นแคลเซียมจากกระดูกปลาจึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจต่อการพัฒนาเพราะเป็นวัสดุเหลือใช้ที่ผลิตขึ้นโดยอุตสาหกรรมแปรรูปปลาอยู่แล้ว ดังนั้นผลของแคลเซียมในกระดูกปลาต่อการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสและคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสของโปรตีนเจลจึงได้รับการพิสูจน์

2.5 การใช้ผงกระดูกปลากระตุ้นการทำงานของทรานสกลูทามิเนสจากปลา

Yin et al. (2010) ได้พิสูจน์ว่าแคลเซียมที่มีอยู่ในกระดูกปลาสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ โดยใช้สารตั้งต้นเป็นเอมีนสังเคราะห์คือโมโนแดนซิลคาตาเวอรินซึ่งเป็นสารที่เรืองแสง (Fluoresce) ได้ และได้เมทิลเคซีนซึ่งเป็นเคซีนดัดแปรให้มีความเหมาะสมเป็นสารตั้งต้นให้กับเอนไซม์ ในภาวะที่มีแคลเซียมที่เพียงพอ เอนไซม์จะเร่งการเชื่อมข้ามระหว่างโมโนแดนซิลคาตาเวอรินกับไดเมทิลเคซีนทำให้ความสามารถในการเรืองแสงของแดนซิลคาตาเวอรินเปลี่ยนไปเราจึงสามารถติดตามการเชื่อมข้ามได้จากการวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ได้ ที่ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและการปลดปล่อยพลังงานที่ 350 และ 480 นาโนเมตร ตามลำดับ ผลจากการศึกษาพบว่า การเติมผงกระดูกปลาที่มีขนาดระดับนาโนเมตรให้ได้แคลเซียมในระดับ 2 มิลลิโมลาร์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นมากที่สุด แต่เมื่อเปรียบเทียบกับแคลเซียมคลอไรด์ก็ส่งผลให้กิจกรรมมีค่าน้อยกว่าการเติมแคลเซียมที่ความเข้มข้น 0.025 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแคลเซียมที่อยู่ในผงกระดูกปลา มีความสามารถในการละลายที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับแคลเซียมคลอไรด์ที่พร้อมต่อการละลาย

นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสโดยผงกระดูกขนาดระดับนาโนเมตรและขนาดไมโครเมตรพบว่า กิจกรรมของทรานสกลูทามิเนสเพิ่มขึ้นจาก 7.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็น 17.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมผงกระดูกระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในขณะที่การเติมผงกระดูกขนาดไมโครเมตรทำให้กิจกรรมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 9.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลดังกล่าวจึงเป็นหลักฐานแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมที่อยู่ในผงกระดูกสามารถถูกละลายออกมาและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสได้ นอกจากนี้ความสามารถในการละลายของแคลเซียมจากกระดูกขนาดใหญ่ น่าจะมีน้อยกว่ากระดูกขนาดเล็กจึงทำให้ปริมาณแคลเซียมที่ละลายได้มีค่าน้อยและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้น้อยเมื่อเทียบในกรณีของผงกระดูกแคลเซียมขนาดระดับไมโครเมตร

ผลจากการศึกษาที่ผ่านมา Hemung (2013) ได้เตรียมผงกระดูกจากปลานิลให้มีขนาดระดับไมโครเมตรแล้วศึกษาความสามารถในการละลายพบว่าความสามารถในการละลายของแคลเซียมในกระดูกปลานิลมีค่าค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามแคลเซียมที่ละลายได้ก็ยังสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสได้

ผลจากการศึกษาทั้งหมดสะท้อนให้เห็นว่ากระดูกปลาสามารถเป็นแหล่งของแคลเซียมได้เป็นอย่างดีและการเก็บเกี่ยวกระดูกปลาเพื่อมาเติมในผลิตภัณฑ์อาหารก็เป็นแนวทางในการเพิ่มคุณค่าทางอาหารได้เป็นอย่างดี โดยแคลเซียมที่เติมลงไปในรูปแบบของผลึกนั้นสามารถถูกย่อยและดูดซึมเพื่อไปใช้ในกระบวนการพัฒนาของกระดูกได้ในลำดับถัดไป นอกจากนี้การเติมผงกระดูกในโปรตีนเจเลนนอกจากจะเป็นแนวทางในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการโดยการเพิ่มแคลเซียมธรรมชาติในผลิตภัณฑ์แล้วแคลเซียมดังกล่าวยังมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ส่งผลให้เกิดการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์จากโปรตีนเจลปลาได้ด้วย อย่างไรก็ตาม ผลของการเติมผงกระดูกต่อคุณลักษณะของระบบอิมัลชันเจลจากเนื้อปลาอันได้แก่ระบบของไส้กรอกเนื้อเนียน (Emulsion gel) ยังไม่เคยได้รับการรายงานและควรได้รับการศึกษา ผลจากการศึกษาหากพบว่าผงกระดูกปลาสามารถเพิ่มคุณลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสให้กับผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้จะก่อให้เกิดผลดีเป็นวงการอุตสาหกรรมไส้กรอกเนื้อเนียนโดยเฉพาะที่ผลิตจากปลาเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังจะทำให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาที่มีอุดมไปด้วยแร่ธาตุแคลเซียมโดยที่ใช้แคลเซียมธรรมชาติจากกระดูกปลาอันเกิดจากการแปรรูปปลาให้เกิดการจัดการวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปปลาอย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

ปลาเกล็ดเงิน ขนาดประมาณ 1200-1500 กรัมต่อตัว และปลานิลขนาดตัวประมาณ 600-800 กรัม (รูปที่ 1) ได้ถูกซื้อมาจากตลาดโพธิ์ชัย อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย โดยปลาจะถูกฆ่าและบรรจุในกล่องโฟม แล้วปิดทับด้วยน้ำแข็งเพื่อควบคุมอุณหภูมิของปลาไว้ให้เย็นและถูกเคลื่อนย้ายมายังห้องปฏิบัติการสาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย โดยใช้ระยะเวลาในการเดินทางประมาณ 30 นาที เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการปลาเหล่านั้นจะถูกตัดหัว ตัดครีบ ควักเครื่องใน ลอกหนัง ส่วนเนื้อและกระดูกกลางลำตัวจะถูกแยกออกจากกัน โดยกระดูกที่รวบรวมได้จากปลาทุกตัวจะถูกบรรจุในถุงพลาสติกก่อนเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะได้รับการศึกษาวิจัย ส่วนเนื้อของปลาทั้งสองชนิดจะถูกรวบรวมและบดผ่านเครื่องบดที่มีรูตะแกรงขนาด 3 มิลลิเมตร เนื้อที่ผ่านการบดจะถูกผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนแยกออกบรรจุถุงพลาสติกเป็นส่วนย่อย ส่วนละ 1000 กรัม และรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะได้รับการศึกษาวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของทรานสกลูทามิเนสอันประกอบด้วยโมโนแดนซิลคาตาเวอรีน (Monodansylcadaverine) ไดเมทิลเคซีน (Dimethylated casien) และไดไทโอเทรียทอล (Dithiotrietol) ถูกซื้อมาจากบริษัท Sigma chemical company (St. Louise, MO, USA) สารเคมีชนิดอื่นๆ เป็นประเภทสำหรับใช้เพื่อการวิเคราะห์ (Analytical grade) ส่วนประกอบอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไส้กรอกมีคุณภาพระดับเชิงการค้า (Commercial grade) และเป็นระดับคุณภาพที่ใช้สำหรับอาหาร (Food grade)

3.2 ตอนที่ 1 การศึกษาคุณลักษณะของกระดูกปลา

3.2.1 การศึกษาคุณลักษณะของผงกระดูกปลา

3.2.1.1 การเตรียมผงกระดูกปลา

กระดูกกลางลำตัวของปลาเกล็ดเงินและปลานิลที่ผ่านการแช่เยือกแข็งได้ถูกทำให้ละลาย (Thaw) โดยการวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นก็นำมาแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้สัดส่วนของก้างต่อสารละลายต่างที่ 1: 5 จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปล้างเอาเศษเนื้อออกโดยให้น้ำไหลผ่านตะแกรงจนน้ำล้างมีความเป็นกลางซึ่งวัดโดยใช้กระดาษลิตมัส นำกระดูกที่ได้ไปให้ความร้อนในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดูกที่ได้ไปบดที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน นำกระดูกที่ได้ไปบดให้เป็นผงโดยใช้เครื่องบดแบบซันตี (Hammer mill) โดยใช้ขนาดของตะแกรง (Sieve) 38 ไมโครเมตร นำผงที่ได้บรรจุในถุงพลาสติกและเก็บแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปศึกษาวิจัย การเตรียมกระดูกปลาด้วยวิธีข้างบนแต่เปลี่ยนจากสารละลายต่างเป็นน้ำเปล่าได้รับการศึกษาเพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเตรียมกระดูกด้วยสารละลายต่างและน้ำ



รูปที่ 1 ปลาเกล็ดเงิน (ก) และปลานิล (ข)

3.2.1.2 การวิเคราะห์ผงกระดูกปลา

3.2.1.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบทางเคมีของผงกระดูกปลาได้รับการวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานของ American Official Analytical Chemists (AOAC) พิมพ์ครั้งที่ 17 ปี ค.ศ. 2000

การหาความชื้นในตัวอย่างทำได้โดยการอบไล่ความชื้นในตู้อบลมร้อนที่ 105 องศาเซลเซียส นานกว่า 12 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักตัวอย่างคงที่ ปล่อยให้ตัวอย่างเย็นและชั่งน้ำหนักตัวอย่างแห้ง คำนวณหาน้ำหนักน้ำที่หายไปและรายงานเป็นร้อยละของความชื้นในแต่ละตัวอย่าง โดยดังกล่าวได้จาก ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ การวิเคราะห์โปรตีนอย่างหยาบโดยใช้วิธีการหาไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) โดยวิธีของ Kjeldahl ด้วยการย่อยตัวอย่างอบแห้งด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นจากนั้นดักเอาไอของแอมโมเนียด้วยกรดบอริกเพื่อทำปฏิกิริยาให้กลายเป็นบอเรต ไทเทรตหาปริมาณบอเรตโดยใช้กรดเกลือความเข้มข้นแน่นอน 0.1 นอร์มัล จากนั้นคำนวณหาปริมาณร้อยละของไนโตรเจนจากสมมูลของกรด เปลี่ยนปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเป็นปริมาณโปรตีนโดยใช้ตัวคูณ (Conversion factor) เป็น 6.25 รายงานร้อยละของโปรตีนในรูปของ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ไขมันอย่างหยาบทำได้โดยการสกัดตัวอย่างอบแห้งด้วย

ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นระเหยตัวทำละลายออกและนำตัวอย่างอบไล่ตัวทำละลาย 30 นาที ซึ่งน้ำหนักของไขมันที่ได้จากการสกัดและรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยที่เกิดจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์เหล่านี้ทั้งหมดทำได้โดยการเผาตัวอย่างอบแห้งที่บรรจุในถ้วยกระเบื้องในตู้อบที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจนสังเกตเห็นว่ามีเถ้าสีขาวเกิดขึ้น ซึ่งน้ำหนักเถ้าและรายงานเป็นค่าเฉลี่ยอันเกิดจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

3.2.1.2.2 การวิเคราะห์สี

สีของผงกระดูกได้ถูกวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดสี (Colorimeter, CR-10; Minolta; Tokyo, Japan) รายงานค่าสีเป็น Hunter L , a , and b เป็นค่าเฉลี่ยที่เกิดจากการวัด 5 ซ้ำ

3.2.1.2.3 การวิเคราะห์ FT-IR

ผงกระดูกที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีการต้มและต้มต่างได้ถูกนำไปวิเคราะห์ถึงหมู่เชิงหน้าที่ของพันธะเคมีที่อยู่ภายในด้วยเทคนิค FT-IR โดยการผสมตัวอย่างกับโพแทสเซียมโบรไมด์แล้วอัดเป็นเม็ด (Tablet) จากนั้นบันทึกการสั่นของโมเลกุลเพื่อพิจารณาหมู่เชิงหน้าที่ (Functional group) ด้วยเครื่อง FT-IR spectroscopy (Spectrum one 60045, Perkin Elmer, England) โดยใช้เครื่อง 6700 โดยบันทึกสเปกตรัม (Spectra) ตั้งแต่หมายเลขคลื่น (Wave number) 4000-450 ต่อเซ็นติเมตร โดยแต่ละ Spectra เกิดจากการเฉลี่ยของการวัด (Scan) ทั้งหมด 32 ครั้ง

3.2.1.2.4 การถ่ายภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

การวิเคราะห์ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดทำได้โดยการนำผงกระดูกไปเคลือบทองแล้วบันทึกภาพถ่ายแบบส่องกราดด้วยเครื่อง Scanning electron microscopy ที่กำลังขยาย 5000 เท่า โดยใช้เครื่อง Hitachi S-3000N (Hitachi, Japan)

3.2.1.2.5 การวิเคราะห์แคลเซียมทั้งหมดและแคลเซียมละลายได้

ผงกระดูกปลาเกล็ดเงินที่เตรียมไว้ได้ถูกนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมโดยการย่อยด้วยกรดไนตริกแล้วตรวจวัดปริมาณแคลเซียมด้วยเทคนิค Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) ด้วยเครื่อง Optima 4300 DV (Perkin Elmer Instruments; Norwalk, CT, USA) และปริมาณแคลเซียมได้ถูกบันทึกด้วยสัญญาณที่ความยาวคลื่น 317.933 นาโนเมตร

ผงกระดูกปลาเกล็ดเงินได้ถูกนำมาผสมกับน้ำด้วยสัดส่วน 1:4 แล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000×g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatmann) แล้วเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมด้วยเทคนิค ICP-OES ดังรายละเอียดที่กล่าวมาแล้ว

3.2.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมกับการสกัดแคลเซียมจากผงกระดูกปลานิลด้วยกรด

3.2.2.1 การศึกษาชนิดกรดที่เหมาะสม

ผงกระดูกถูกนำมาผสมกับกรด 5 ชนิดได้แก่ กรดกำมะถัน (Sulphuric acid) กรดไนตริก (Nitric acid) กรดเกลือ (Hydrochloric acid) กรดน้ำส้ม (Acetic acid) และกรดมะนาว (Citric acid) ในสัดส่วน 1:20 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยกรดดังกล่าวความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ของผสมดังกล่าวถูกนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองและทำการตกตะกอนให้อยู่ในรูปของแคลเซียมออกซาเลต จากนั้นละลายออกซาเลตกลับด้วยกรดกำมะถันและหาปริมาณแคลเซียมในส่วนที่ละลายด้วยการไทเทรตโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox

titration) โดยแสดงผลการสกัด (Extractability) ในรูปของการเทียบเป็นร้อยละกับค่าสูงสุด (Normalized extractability)

3.2.2.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดอะซิติกได้ถูกศึกษาในช่วง 0.03 0.06 0.12 0.25 0.5 และ 1.0 โมลาร์ โดยควบคุมสภาวะการในการสกัดให้เหมือนกับการทดลองตอนที่ผ่านมาและรายงานผลการสกัดในรูปของ Normalized extractability

3.2.2.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสม

เวลาที่เหมาะสมต่อการใช้กรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ได้รับการศึกษาตั้งแต่ 1 3 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยควบคุมสภาวะการในการสกัดให้เหมือนกับการทดลองตอนที่ผ่านมาและรายงานผลการสกัดในรูปของ Normalized extractability

3.2.2 การการสกัดแคลเซียมจากผงกระดูกปลานิลด้วยกรดอะซิติกในสภาวะที่เหมาะสม

3.2.2.1 การสกัดแคลเซียมด้วยกรดอะซิติก

ผงกระดูกปลานิลได้ถูกผสมกับกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ด้วยสัดส่วน 1:20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรอง (Wattman® เบอร์ 1) นำสารละลายที่ได้ไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 ก่อนนำส่งวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่แน่นอน

3.2.2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคลเซียมในสารสกัด

ความเข้มข้นของแคลเซียมในสารละลายถูกตรวจสอบโดยเทคนิค Inductive couple plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) ตามรายละเอียดที่กล่าวมาแล้ว

3.3 ตอนที่ 2 ผลของกระดูกปลาเกล็ดเงินต่อคุณภาพไส้กรอกปลาเกล็ดเงิน

3.3.1 การเตรียมผงกระดูกปลาเกล็ดเงิน

ผงกระดูกปลาเกล็ดเงินที่เตรียมโดยการแช่ในสารละลายต่าง (NaOH) มีคุณสมบัติที่ดีกว่าแบบที่เตรียมด้วยน้ำเปล่า เนื่องจากมีปริมาณเถ้าซึ่งสะท้อนถึงปริมาณแร่ธาตุมากที่สุด นอกจากนั้นยังมีปริมาณอินทรีย์สารอันได้แก่ ไนโตรเจนและโปรตีนต่ำ ดังนั้นเฉพาะตัวอย่างผงกระดูกที่เตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จึงถูกเลือกมาใช้ประเมินผลกระทบต่อคุณภาพด้านต่างๆ เมื่อเติมลงในไส้กรอกอิมัลชันจากปลา รายละเอียดในการเตรียมผงกระดูกเป็นไปแบบเดียวกับที่อธิบายในการทดลองตอนที่ 1 เรื่องการเตรียมผงกระดูกปลา

3.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมทรานสกลูตามิเนสที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้จากปลาเกล็ดเงิน

เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสอย่างหยาบ (Crude transglutaminase) จากกล้ามเนื้อปลาเกล็ดเงินถูกสกัดออกมาตามวิธีการที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ (Hemung et al., 2008) กิจกรรมของสารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบถูกตรวจสอบโดยวัดจากความสามารถในการเชื่อมข้ามเอมีนสังเคราะห์ (MDC) เข้าไปในโครงสร้างของเคซีนดัดแปร (DMC) และติดตามกิจกรรมที่เกิดขึ้นภายหลังการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที โดยส่วนผสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยบัฟเฟอร์ (Tris-Cl, pH 7.5) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ไตเมทิลเคซีน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) DTT (3 มิลลิโมลาร์) MDC (15 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) ปริมาณแคลเซียมจากส่วนใสถูกเติมลงในส่วนผสมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 และ 1000 นาโนโมลาร์ และเปรียบเทียบกับแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1000 นาโนโมลาร์ ภายหลังการบ่มตัวอย่างทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม

สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 400 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นได้นำสารละลายไปวัดความเข้มของการเรืองแสง (Fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่นกระตุ้นและปลดปล่อยพลังงาน 350 และ 480 ตามลำดับ (F-2700 FL Spectrofluorometer, Hitachi, Japan) หนึ่งหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ถูกให้คำจำกัดความว่าเป็นปริมาณของ MDC ที่ถูกเชื่อมเข้ากับเคซินตัดแปรรูปเมื่อใช้เอนไซม์ 1 มิลลิลิตรในสภาวะการเร่งปฏิกิริยาที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที

การวิเคราะห์กิจกรรมดังกล่าวได้เปรียบเทียบกับระหว่างตัวอย่างที่ไม่เติมแคลเซียมใดๆ ให้เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) และตัวอย่างที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นเท่ากันกับแคลเซียมละลายได้เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control)

3.3.3 การวิเคราะห์การเชื่อมข้ามโปรตีนด้วยทรานสกลูทามิเนสที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้

3.3.3.1 สารสกัดแคลเซียม สารสกัดแคลเซียมถูกเตรียมดังรายละเอียดในข้อ 3.2.2.2.5

3.3.3.2 สารสกัดเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส ดังรายละเอียดในข้อ 3.3.2

3.3.3.3 การสกัดโปรตีนกล้ามเนื้อ

กล้ามเนื้อปลาเกล็ดเงินถูกบดผสมกับสารละลายเกลือ 10 มิลลิโมลาร์ Tris-Cl, 50 มิลลิโมลาร์ ควบคุมค่า pH 7.5 โดยให้สัดส่วนของเนื้อปลาต่อสารละลายเป็น 1:10 จากนั้นนำของผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $8,000 \times g$ และเก็บเอาตะกอนมาล้าง จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนก่อนหน้านี้อีก 2 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปปั่นผสมกับสารละลายเกลือ 0.6 โมลาร์ในสภาวะที่ Tris-Cl, pH 7.5 แล้วนำของผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ $8,000 \times g$ เก็บเกี่ยวส่วนใสมารอกผ่านผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปละลายในน้ำเกลือ 10 มิลลิโมลาร์ แล้วนำของผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ $1,000 \times g$ เก็บตะกอนเพื่อใช้เป็นตัวตัวอย่างของโปรตีนกล้ามเนื้อสกัด (Myofibrillar protein) โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ Biuret method

3.3.3.4 การทำปฏิกิริยาเชื่อมข้ามโปรตีนกล้ามเนื้อ

การเชื่อมข้ามของโปรตีนทำโดยการควบคุมสัดส่วนของโปรตีนกล้ามเนื้อ (Myofibrillar protein) ปลาเกล็ดเงินต่อสารสกัดเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสเป็น 9:1 โดยบดผสม (Homogenize) ส่วนประกอบดังกล่าวกับเกลือร้อยละ 2 และบ่มตัวอย่างที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ในสภาวะที่มีและไม่มีแคลเซียมความเข้มข้น 1,000 นาโนโมลาร์ จากนั้นนำตัวอย่างมาบดผสมกับสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปั่นเหวี่ยงของผสมที่ได้ที่ความเร็ว $5000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใส (โปรตีนละลาย, Soluble protein) ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ Biuret โดยมีอัลบูมินจากวัว (Bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.3.3.5 การวิเคราะห์แบบแผนของโปรตีน

แบบแผนของโปรตีนที่อยู่ในสารละลายที่ได้จากข้อ 2.3.3 ได้ถูกนำมาผสมกับบัฟเฟอร์สำหรับแยกตัวอย่างด้วยเทคนิคการแยกโปรตีนภายใต้สนามไฟฟ้า (Electrophoresis) ในสภาวะที่มีการให้ความร้อนและมีการเติมสารรีดิวซ์เพื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพอย่างสมบูรณ์แบบ นำโปรตีนที่ได้ไปแยกบนแผ่นเจลอะครีลาไมด์ที่มีความหนา 0.75 มิลลิเมตร โดยเจลมีความเข้มข้นร้อยละ 10 ในขณะที่เจลส่วนบนมีความเข้มข้นร้อยละ 4 ทำการแยกภายใต้สนามไฟฟ้าด้วยความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ รอจนกระทั่งตัวอย่างเคลื่อนที่เกือบถึงจุดสิ้นสุดของแผ่นเจล โดยควบคุมปริมาณโปรตีนในแต่ละแถว (Lane) ให้มีปริมาณเท่ากันที่ 20 ไมโครกรัม โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 2 แถว และเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนสกัด เทียบกับโปรตีนสกัดบ่มในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดแคลเซียมจากผงกระดูกปลา เมื่อสิ้นสุดการแยกนำแผ่นเจลที่ได้ไป

ย้อมด้วยสีย้อมสีน้ำเงิน (Coomassie brilliant blue) และล้างสีย้อมออกก่อนทำการบันทึกภาพแถบของโปรตีน เปรียบเทียบขนาดของโปรตีนในแต่ละแถบกับโปรตีนมาตรฐานชนิดกว้าง (Board range standard)

3.3.4 การผลิตไส้กรอกปลา

ไส้กรอกปลาถูกเตรียมด้วยสูตรคล้ายคลึงกับ Bologna ดังที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Chin *et al.*, 1999) โดยไขมันในสูตรไส้กรอกจะถูกลดลงโดยใช้สารทดแทนไขมันที่เกิดจากส่วนผสมของผงบุกและคาราจีแนน โดยสารทดแทนไขมันถูกเตรียมโดยการผสมคาราจีแนนกับผงบุกด้วยสัดส่วน 1:1 แล้วนำส่วนผสมที่ได้ไปผสมกับน้ำด้วยสัดส่วนของส่วนผสม 1:10 โดยการปั่นน้ำก่อนแล้วเติมส่วนผสมลงไปปั่นตาม สารที่ได้จะมีลักษณะข้นหนืดและใช้เป็นสารทดแทนไขมัน โดยสูตรในไส้กรอกได้ควบคุมปริมาณเนื้อปลาเกล็ดเงิน สารทดแทนไขมัน น้ำมันข้าวโพด กลีโธ แป้งข้าวโพด น้ำตาลทราย และเครื่องเทศ ไว้ที่ร้อยละ 50 10 10 2 3 3 และ 2 ตามลำดับ ส่วนประกอบที่เหลือเป็นน้ำที่เติมในรูปของน้ำแข็งเกล็ดบด ผงกระดูกปลาเกล็ดเงินได้ถูกเติมให้ถึงความเข้มข้นร้อยละ 1 การเตรียมส่วนผสมไส้กรอก (Batter) เริ่มต้นจากการสับผสมเนื้อปลารวมกับเกล็ดด้วยเครื่องสับผสม (Champ; Kent, UK) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมน้ำแข็งครึ่งหนึ่งของสูตรและสับผสมรวมกับส่วนผสมอื่นๆที่เป็นผงและสับผสมต่อเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมน้ำมันลงไปและสับผสมต่ออีก 2 นาที ท้ายสุดเติมน้ำแข็งที่เหลือและสับผสมต่ออีก 3 นาที กระบวนการทั้งหมดทำให้ได้อุณหภูมิของส่วนผสมไม่เกิน 12 องศาเซลเซียส ส่วนผสมที่ได้ถูกนำไปอัดใส่ในไส้คอลลาเจนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร (Nippi Corp.; Yokohama, Japan) ด้วยเครื่องอัดไส้กรอก (Stuffer) จากนั้นมัดไส้กรอกให้เป็นท่อนๆโดยใช้เชือกฝ้าย (Cotton rope) ให้ได้ไส้กรอกมีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นไส้กรอกที่มัดเสร็จแล้วก็ถูกนำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในอ่างน้ำร้อนอีกเครื่องที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส (Memmert, GmbH; Schwabach, Germany) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตัวอย่างไส้กรอกที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วจะถูกทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่เย็นตัวแล้วไปเก็บในตู้เย็นข้ามคืนก่อนนำไปวัดตรงจุด

3.3.5 การวิเคราะห์คุณภาพไส้กรอกปลา

3.3.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบทางเคมีของผงกระดูกปลาได้รับการวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานของ American Official Analytical Chemists (AOAC) พิมพ์ครั้งที่ 17 ปี ค.ศ. 2000 ดังรายละเอียดที่แสดงในตอนที 1 โดยค่าที่ได้เกิดจากการเฉลี่ยที่เกิดจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

3.3.5.2 การตรวจวัดค่าสี

ตัวอย่างไส้กรอกถูกตัดออกเป็นท่อนที่มีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร และวัดสีที่บริเวณพื้นที่ตัดขวาง (Cross-sectional area) ด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter, CR-10; Minolta; Tokyo, Japan) รายงานค่าสีเป็น Hunter L, a, and b เป็นค่าเฉลี่ยที่เกิดจากการวัด 5 ซ้ำ ตามวิธีการที่รายงานมาก่อนหน้านี้ (Hemung and Chin, 2014)

3.3.5.3 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

ไส้กรอกจะถูกหั่นออกเป็นชิ้นทรงกระบอกที่มีความกว้าง ยาว และสูง $1 \times 1 \times 1.5$ เซนติเมตรเพื่อหลีกเลี่ยงการวัดเนื้อสัมผัสอันเกิดจากไส้คอลลาเจน แบบแผนของเนื้อสัมผัสได้ถูกตรวจวัดโดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (TA-XT2, Micro Stable Systems; Godalming, UK) โดยใช้หัววัดทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ความเร็วของหัววัดทั้งก่อนและหลังการวัดถูกควบคุมไว้ที่ 5 มิลลิเมตรต่อวินาที

ตัวอย่างจะถูกทดสอบรอบอย่างต่อเนื่องเพื่อเลียนแบบการเคี้ยวอาหารจนกระทั่งตัวอย่างถูกกดลงไปเป็นระยะทางร้อยละ 75 เมื่อเทียบกับส่วนสูงเริ่มต้นของตัวอย่าง แบบแผนเนื้อสัมผัสถูกตรวจวัดและรายงานเป็นค่าความแข็ง ความเป็นสปริง ความเป็นกัม แรงยึดเกาะและแรงยึดเหนี่ยวภายใน โดยค่าดังกล่าวเกิดจากการเฉลี่ยจากการวัด 7 ซ้ำ

3.3.5.4 การประเมินทางประสาทสัมผัส

การประเมินทางประสาทสัมผัสถูกประเมินโดยใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ได้รับการฝึกอบรม (Untrained panelists) จำนวน 60 คนซึ่งมีอายุอยู่ระหว่าง 18-44 ปี โดยการประเมินความชอบด้วย Hedonic scale ได้จัดขึ้นในห้องปฏิบัติการที่ใช้สำหรับการประเมินผลิตภัณฑ์ทางด้านประสาทสัมผัส ตัวอย่างไส้กรอกจะถูกตัดให้มีขนาดเท่ากัน (1.5 เซนติเมตร) แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 1 นาที โดยตัวอย่าง 3 ชิ้น จะถูกนำมาบริการให้กับผู้ทดสอบชิมแต่ละคน แบบทดสอบที่มีระดับการให้คะแนนทั้งหมด 9 ระดับ (A nine-point scale) ได้ถูกนำเสนอให้ผู้ทดสอบประเมินความชอบของผู้บริโภคต่อคุณลักษณะด้านคุณภาพ (Sensory attributes) อันได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี เนื้อสัมผัส กลิ่นรส และการยอมรับโดยรวม

3.3.7 การประเมินความแตกต่างทางสถิติ

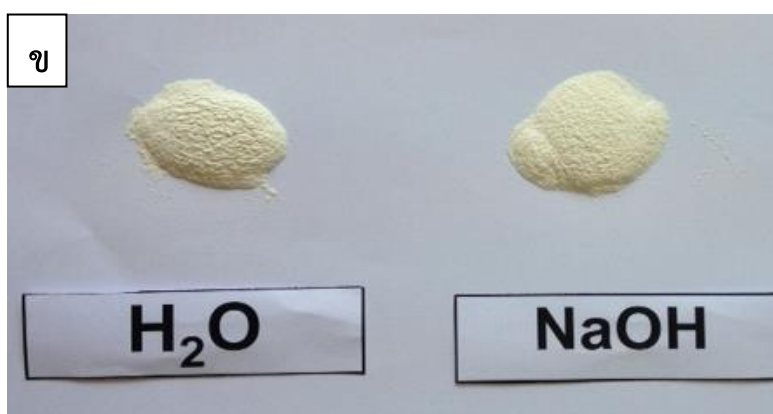
ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละตัวอย่างจะถูกประเมินโดยใช้การเปรียบเทียบแบบ t -test และระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญถูกค่านิ่งที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS 16.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA)

บทที่ 4

4.1 ตอนที่ 1

4.1.1 คุณลักษณะของผงกระดูกปลา

กระดูกปลาเกล็ดเงินและปลานิลสามารถนำมาผลิตเป็นผงกระดูกขนาดละเอียดได้อย่างสำเร็จไม่ว่าจะใช้วิธีกำจัดเศษเนื้อออกจากกระดูกด้วยสารละลายต่างหรือน้ำเปล่า โดยผงกระดูกที่ได้สุดท้ายแล้วจะมีลักษณะเป็นผงละเอียด แห้ง มีขาวนวล หากพิจารณาด้วยตาเปล่าอาจไม่พบข้อแตกต่างระหว่างทั้งสองตัวอย่าง (รูปที่ 2) ถึงแม้ว่าลักษณะปรากฏของผงกระดูกที่ได้จะไม่มี ความแตกต่างกันแต่ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการบำบัดด้วยสารละลายต่างจะมีกลิ่นปลาค่อนข้างรุนแรงกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดเนื้อด้วยการต้มในสารละลายต่าง ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารอินทรีย์ที่ก่อให้เกิดกลิ่นในตัวอย่างที่ต้มน้ำน่าจะมีมากกว่า ดังนั้นการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผงกระดูกจึงน่าจะเป็นหลักฐานที่สนับสนุนข้อสันนิษฐานดังกล่าว



รูปที่ 2 ผงกระดูกปลาเกล็ดเงิน (ก) และปลานิล (ข) ที่มีขนาดเล็กกว่า 38 ไมโครเมตรที่ได้จากการต้ม น้ำและต่าง

4.1.1.1 องค์ประกอบทางเคมี

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์องค์ประกอบอย่างหยาบ (Proximate analysis) พบว่าผงกระดูกที่เตรียมได้ยังมีความชื้นอยู่ถึงแม้จะให้ลักษณะเป็นผงแห้งก็ตาม ปริมาณความชื้นที่มีอยู่ในตัวอย่างมีค่าระหว่างร้อยละ 3-4 (ตารางที่ 6 และ 7) จะเห็นได้ว่าความชื้นในผงกระดูกที่เตรียมได้ด้วยดังมีค่ามากกว่าตัวอย่างที่เตรียมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติไม่ว่าจะเป็นผงกระดูกจากปลาเกล็ดเงินหรือปลานิล โดยปกติแล้วโมเลกุลของน้ำชั้นแรก (Monolayer water) จะจับยึดอยู่กับอนุภาคของสารด้วยแรงที่ค่อนข้างแข็งแรงจึงยากต่อการกำจัดออก ดังนั้นตัวอย่างผงกระดูกปลาแม้ผ่านการอบมาแล้วแต่ก็ยังมียังมีน้ำอยู่ นอกจากนั้นอาจมีความเป็นไปได้ว่าผงกระดูกที่ผ่านการอบแห้งแล้วมีการดูดน้ำกลับระหว่างการเก็บรักษาเนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการเก็บผงกระดูกไม่ได้อยู่ในตู้ดูดความชื้น สภาวะดังกล่าวทำให้ความชื้นในตัวอย่างน้อยกว่าในบรรยากาศ น้ำจากบรรยากาศจึงเข้าไปจับกับพื้นผิวของผงกระดูก ทำให้เราสามารถตรวจพบความชื้นในผงกระดูกได้ ข้อมูลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าผงกระดูกที่เตรียมได้จากต่างมีความสามารถในการจับน้ำได้ดีกว่า ทั้งนี้กลไกในการจับอาจอธิบายได้หลายแบบ ไม่ว่าจะเป็นปริมาณอินทรีย์สารที่เป็นองค์ประกอบหรือแม้กระทั่งพื้นผิวของผงกระดูก การที่ผงกระดูกปลาที่เตรียมได้มีความชื้นต่ำน่าจะทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานเนื่องจากปริมาณน้ำไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์และอีกอย่างก็ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการเกาะกันเป็นก้อนอีกด้วย

ปริมาณโปรตีนอย่างหยาบ (Crude protein) ในผงกระดูกได้รับการประเมินโดยการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนแสดงดัง ตารางที่ 6 และ 7 ซึ่งทำให้เห็นว่าผงกระดูกยังคงมีโปรตีนหลงเหลืออยู่ ปริมาณที่พบในปลานิลที่ศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับที่พบในครั้งก่อน (Hemung, 2013) ทั้งนี้เนื่องจากใช้วิธีการและตัวอย่างกระดูกจากปลาชนิดเดิม แต่ปริมาณโปรตีนจากกระดูกปลาทั้งคู่พบว่ามีค่าน้อยกว่าที่พบในผงกระดูกปลา Cod, Saithe, Blue whiting, Salmon, Trout, Herring และ ปลา Mackerel ที่พบว่ามีโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 26-41 (Toppe et al., 2007) โดยความแตกต่างดังกล่าวน่าจะเกิดมาจากวิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน

เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในผงกระดูกจากปลาทั้งสองชนิดที่ผ่านการต้มด้วยสารละลายต่างมีค่าน้อยกว่าที่ต้มด้วยน้ำเกือบเท่าตัว แสดงให้เห็นว่าต่างสามารถละลายโปรตีนในกระดูกได้ดี โปรตีนจึงถูกชะออกมาทำให้ผงกระดูกที่ได้มีโปรตีนต่ำ ปกติแล้วโปรตีนที่อยู่ในกระดูกมักจะเป็นคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติพิเศษคือไม่ละลายน้ำและยากแก่การกำจัด โดยที่การจัดเรียงตัวของคอลลาเจนอาจอยู่รอบนอกผลึกของแอฟฟาไทท์ (Jager and Fratzl, 2000; Weiner and Traub, 1989) หรือจัดเรียงตัวอยู่ระหว่างเส้นใยของคอลลาเจน (Hellmich and Ulm, 2002) ก็เป็นไปได้ เมื่อนำกระดูกไปต้มกับสารละลายต่างจึงทำให้ต่างไปละลายคอลลาเจนออกมาจากส่วนประกอบเชิงซ้อนทำให้โปรตีนถูกกำจัดออกได้มากขึ้น ดังนั้นการต้มกระดูกกับน้ำอาจกำจัดโปรตีนกลั่นเนื้อที่ติดกับกระดูกได้ดีแต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนคอลลาเจนที่แทรกตัวอยู่กับโครงสร้างกระดูกได้ แต่เมื่อกระดูกถูกต้มกับสารละลายต่างในสภาวะที่ร้อนจะทำให้คอลลาเจนสามารถละลายได้ดีจนถูกชะออกมาได้ดีกว่าเมื่อผ่านกระบวนการล้างด้วยน้ำ

ปริมาณอินทรีย์สารอันได้แก่โปรตีนและไขมันในผงกระดูกที่ต้มน้ำมีมากกว่าในตัวอย่างที่ต้มต่าง แต่กลับพบว่าความชื้นในตัวอย่างดังกล่าวมีค่าน้อยกว่า ทั้งๆ ที่อินทรีย์สารเหล่านั้นได้รับรายงานว่ามีความชื้นสูงที่ที่สามารถดูดกับน้ำได้ดี ดังนั้นการที่ตัวอย่างผงกระดูกที่ผ่านการต้มต่างสามารถดูดความชื้นได้มากกว่าตัวอย่างต้มน้ำนั้นจึงไม่น่าจะมาจากการดูดน้ำของอินทรีย์สารแต่น่าจะมาจากการดูดน้ำของอนินทรีย์สารมากกว่า

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของผงกระดูกปลาเกล็ดเงินที่ผ่านการต้มน้ำและต้มต่าง

องค์ประกอบ	สารที่ใช้ในการกำจัดเนื้อ	
	น้ำ	สารละลายต่าง (NaOH, 0.8%)
ความชื้น	3.25 ± 0.19^b	4.94 ± 0.16^a
โปรตีน	22.40 ± 0.11^a	13.27 ± 0.15^b
ไขมัน	0.70 ± 0.17^a	0.12 ± 0.07^b
เถ้าทั้งหมด	64.45 ± 0.10^b	73.47 ± 0.18^a

*a-b ที่เป็นตัวเลขยกกำลังแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของผงกระดูกปลานิลที่ผ่านการต้มน้ำและต้มต่าง

องค์ประกอบ	สารที่ใช้ในการกำจัดเนื้อ	
	น้ำ	สารละลายต่าง (NaOH, 0.8%)
ความชื้น	1.82 ± 0.16^b	2.67 ± 0.26^a
โปรตีน	21.46 ± 0.20^a	17.77 ± 0.20^b
ไขมัน	6.96 ± 0.11^a	3.12 ± 0.04^b
เถ้าทั้งหมด	65.00 ± 0.14^b	70.16 ± 0.03^a

*a-b ที่เป็นตัวเลขยกกำลังแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปริมาณไขมันอย่างหยาบ (Crude fat) ในตัวอย่างกระดูกที่ผ่านการต้มด้วยต่างก็มีปริมาณน้อยมาก โดยคิดเป็นร้อยละ 0.7 เมื่อกระดูกปลาเกล็ดเงินผ่านการต้มน้ำ ตารางที่ 6 ส่วนปลานิลจะมีไขมันเหลืออยู่มากกว่าปลาเกล็ดเงินเมื่อต้มด้วยน้ำเหมือนกัน (ตารางที่ 6 และ 7) อย่างไรก็ตามปริมาณไขมันที่หลงเหลือในกระดูกปลานิลพบว่ามีปริมาณน้อยกว่าเกือบ 3 เท่า โดยพบปริมาณไขมันคิดเป็นร้อยละ 3.12 (ตารางที่ 6) ผลดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณโปรตีนข้อมูลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าการใช้ต่างต้มกับกระดูกจะทำให้ช่วยกำจัดอินทรีย์สารออกจากผงกระดูกได้มากกว่าการใช้ น้ำ เมื่ออินทรีย์สารถูกกำจัดออกมาดังนั้น องค์ประกอบหลักอันหมายถึงปริมาณแร่ธาตุในตัวอย่างต้มต่างจึงน่าจะมีมากกว่าตัวอย่างที่ต้มด้วยน้ำเพียงเท่านั้น ปริมาณไขมันที่พบในผงกระดูกปลาในการทดลองนี้มีค่าน้อยกว่าที่พบในผงกระดูกปลานิลเมื่อผ่านกระบวนการเตรียมที่คล้ายกัน (Hemung, 2013) และปริมาณดังกล่าวใกล้เคียงกับที่พบในกระดูกปลา Cod และ ปลา Saithe (Toppe et al., 2007)

ปริมาณเถ้าทั้งหมดที่ตรวจวัดโดยกระบวนการเผาเถ้าพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการต้มด้วยต่างมีปริมาณเถ้ามากกว่าตัวอย่างกระดูกที่ผ่านการต้มด้วยน้ำซึ่งเป็นไปตามที่คาดหมายสำหรับปลาทั้งสองชนิด (ตารางที่ 6 และ 7) เนื่องจากการใช้ต่างจะทำให้สามารถกำจัดโปรตีนจำพวกคอลลาเจนและไขมันออกจากกระดูกได้ดีจึงทำให้ องค์ประกอบส่วนใหญ่ที่เหลืออยู่เป็นเถ้าซึ่งสะท้อนให้เห็นปริมาณแร่ธาตุ โดยผงกระดูกปลานิลมีปริมาณเถ้าทั้งหมดมากกว่าผงกระดูกจากปลาเกล็ดเงินทั้งนี้เนื่องมาจากสัดส่วนอินทรีย์สารในปลาเกล็ดเงินมีมากกว่า ผลจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีสะท้อนให้เห็นว่าผงกระดูกที่เตรียมได้จากปลาทั้งสองชนิดมีศักยภาพเป็นแหล่งของแร่ธาตุได้

เมื่อพิจารณาผลขององค์ประกอบทางเคมีจะพบว่ากระดูกที่ผ่านการต้มต่างมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของแร่ธาตุแคลเซียมได้มากกว่าการต้มน้ำ ทำให้ได้สัดส่วนระหว่างเถ้าต่อโปรตีนมีค่าเป็น 5.54 และ 2.88 สำหรับกระดูกปลาเกล็ดเงินที่ต้มน้ำและต่าง ตามลำดับ ส่วนค่าดังกล่าวสำหรับผงกระดูกปลานิลมีค่า 3.03 และ 3.95 ตามลำดับ ค่าดังกล่าวอาจสะท้อนถึงความสมบูรณ์ของการกำจัดอินทรีย์สารออกจากกระดูกและยังแสดงให้เห็นถึงความสมบูรณ์ของการพัฒนาการทางกระดูก (Bone mineralization) ค่าดังกล่าวสำหรับผงกระดูกปลาหลายชนิดพบว่ามีความต่ำกว่า 1.00 (Toppe et al, 2007)

ดังนั้นการกำจัดอินทรีย์สารด้วยสารละลายต่างจึงเป็นหนึ่งในกระบวนการทำให้กระดูกมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการต้มต่างจึงควรได้รับการเลือกให้เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการนำไปเตรียมผงกระดูกเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ

4.1.1.2 สี

สีของผงกระดูกได้รับการประเมินโดยวัดด้วยเครื่องวัดสีที่แสดงผลของค่าสีออกมาเป็น 3 ค่าอันได้แก่ ค่าความสว่าง (Lightness) ที่มีค่าตั้งแต่ 0-100 โดย 0 หมายถึงสว่างน้อยที่สุด และ 100 หมายถึงสว่างมากที่สุด นอกจากนั้นองค์ประกอบของสีมิติที่สอง คือ ค่าความเป็นสีฟ้าและสีเหลือง (Blueness and yellowness) ได้รับการบันทึกในรูปของค่า b^* โดยที่ค่า b^* เป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นสีเหลือง ส่วนค่าดังกล่าวเป็นลบแสดงว่ามีความเป็นสีน้ำเงิน องค์ประกอบของสีมิติที่สาม คือค่าความเป็นสีแดงและสีเขียวที่วัดได้จากค่า a^* โดยค่า a^* เป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นสีแดงส่วนค่าดังกล่าวเป็นสีเขียวเมื่อค่า a^* เป็นลบ ผลจากการวัดสีพบว่าผงกระดูกปลาเกล็ดเงินที่เตรียมได้จากการต้มต่างมีค่าความสว่างน้อยกว่ากระดูกต้มน้ำ (ตารางที่ 8) แต่ค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันสำหรับปลานิล (ตารางที่ 9) นอกจากนั้นยังมีความเป็นสีแดงเนื่องจากตรวจพบค่า a^* เป็นบวกและค่าความเป็นสีแดงของกระดูกต้มต่างก็มีค่ามากกว่าตัวอย่างต้มน้ำทั้งในปลาเกล็ดเงินและปลานิล (ตารางที่ 8 และ 9) ค่าความเป็นสีเหลืองของกระดูกจากปลาทั้งสองชนิดก็เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือตัวอย่างที่ได้จากการต้มต่างมีค่ามากกว่าตัวอย่างที่ต้มน้ำ

ผลจากการวัดดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าผงกระดูกที่ดูด้วยตาเปล่าว่ามีสีเหมือนกันแต่ที่จริงแล้วมีความแตกต่างกันทางด้านองค์ประกอบสี อาจกล่าวได้ว่าการต้มกระดูกด้วยต่างจะทำให้ได้ผงกระดูกมีสีคล้ำมากกว่าทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาระหว่างต่างและโปรตีนที่อยู่ในกระดูกทำให้กระดูกมีสีดำในขณะที่ตัวอย่างต้มน้ำไม่เกิดปฏิกิริยาดังกล่าว

ถึงแม้ว่าผงกระดูกที่ได้จากการต้มด้วยต่างจะมีความคล้ำกว่ากระดูกที่ต้มน้ำแต่ความแตกต่างดังกล่าวอาจถูกสังเกตด้วยตาผู้คนได้ลำบากเพราะโดยภาพรวมแล้วผงกระดูกยังมีค่าความสว่างที่สูงทำให้ยากต่อการแยกแยะด้วยตาเปล่า เมื่อพิจารณาถึงคุณลักษณะด้านสีแล้วก็พบว่าสีของผงกระดูกที่เกิดขึ้นทำให้ผงกระดูกกระดูกที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้เพื่อเป็นสารเติมแต่งในอาหารประเภทที่มีขาวนวล ขาวครีม หรือผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องคำนึงถึงความขาวมากนัก ดังนั้นการนำไปเติมในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกซึ่งเน้นให้ตัวอย่างมีสีแดงจึงมีความเป็นไปได้ และเห็นควรว่าตัวอย่างที่ได้จากการต้มต่างน่าจะมีความเหมาะสมกว่าเพราะมีความเป็นสีแดงที่มากกว่า

ตารางที่ 8 ค่าสีของผงกระดูกปลาเกล็ดเงินที่ผ่านต้มน้ำและด่าง

ค่าสี	สารที่ใช้ในการกำจัดเนื้อ	
	น้ำ	สารละลายด่าง (NaOH, 0.8%)
Hunter L^*	89.95 ± 0.06^a	81.15 ± 0.10^b
Hunter a^*	3.01 ± 0.03^b	5.28 ± 0.02^a
Hunter b^*	12.49 ± 0.06^b	23.26 ± 0.12^a

*a-b ที่เป็นตัวเลขยกกำลังแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 9 ค่าสีของผงกระดูกปลานิลที่ผ่านต้มน้ำและด่าง

ค่าสี	สารที่ใช้ในการกำจัดเนื้อ	
	น้ำ	สารละลายด่าง (NaOH, 0.8%)
Hunter L^*	88.78 ± 0.15^{ns}	89.42 ± 0.07^{ns}
Hunter a^*	3.47 ± 0.00^b	4.25 ± 0.00^a
Hunter b^*	13.85 ± 0.10^b	16.35 ± 0.09^a

*a-b ที่เป็นตัวเลขยกกำลังแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.1.1.3 FT-IR

หมู่เชิงหน้าที่ของสารที่เป็นองค์ประกอบในผงกระดูกที่ได้จากการเตรียมได้รับการตรวจสอบโดยอาศัยคลื่นอินฟราเรดที่ผ่านเทคนิค Flurier transform spectroscopy โดยเทคนิคดังกล่าวจะเน้นวัดการสั่นสะเทือนของพันธะในโมเลกุลของสารและนำข้อมูลดังกล่าวมาตีความหมายให้เป็นหมู่เชิงหน้าที่จะทำให้ทราบโครงสร้างทางเคมีรวมถึงการจัดเรียงตัวของธาตุต่างๆ และรายงานออกมาเป็นข้อมูลดังแสดงใน รูปที่ 3ก ซึ่งพบความแตกต่างของสัญญาณที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยดังจะพบว่าโดยรวมของแบบแผนที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก เมื่อพิจารณาจากสัญญาณดังกล่าวจะพบว่าสัญญาณที่สะท้อนให้เห็นการสั่นของหมู่ฟอสเฟต (PO^3) อยู่บริเวณหมายเลขคลื่น 560.86 ซึ่งสอดคล้องกับที่ได้รายงานมาก่อนหน้านี้ (Prabakaran and Pajeswari, 2006) ในขณะที่หมู่ดังกล่าวเปลี่ยนไปเล็กน้อยโดยพบที่ 564.03 เมื่อตัวอย่างผ่านการต้มด้วยด่าง นอกจากนั้นการสั่นสะเทือน (Stretching) ของหมู่ Hydroxyl ก็ปรากฏที่หมายเลขคลื่น 3401.35 และ 3423.71 ในตัวอย่างที่ต้มน้ำและต้มด่าง ตามลำดับ การปรากฏของหมายเลขคลื่นเหล่านั้นทำให้ทราบว่าในผงกระดูกประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตและหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งก็ตรงกับที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Piccirillo et al., 2013) ที่ระบุว่าโครงสร้างของกระดูกประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแคลเซียมฟอสเฟตที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ด้วยหรือที่เรียกว่า แคลเซียมไฮดรอกซิฟอสเฟตแบบแอฟฟาไทท์ (Ca-hydroxyapatite) ถึงแม้ว่าการตรวจวัดแรงสั่นสะเทือนของโมเลกุลแคลเซียมด้วยเทคนิคนี้จะไม่สามารถเป็นไปได้เนื่องจากแคลเซียมเป็นธาตุโลหะ งานวิจัยที่ผ่านมาบางงานได้ตรวจพบสัญญาณอันเกิดจากการยึดหดหรือการสั่นสะเทือนของหมู่คาร์บอนेटในแอฟฟาไทท์ที่ผลิตจากได้จากระดุกปลาด้วยกระบวนการเผาไหม้ที่อุณหภูมิสูง (Calcination) ประมาณ 600-1000 องศาเซลเซียสโดยพบสัญญาณเหล่านั้นที่หมายเลขคลื่นประมาณ 1451 และ 1418 (Boutinguiza et al., 2012) สัญญาณดังกล่าวได้ถูกตรวจพบในตัวอย่างผงกระดูกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แต่

สัญญาณดังกล่าวไม่น่าจะมาจากคาร์บอนเตเพราะตัวอย่างในการทดลองนี้ไม่ได้ผ่านการเผาไหม้ถึงแม้จะผ่าน การให้ความร้อนสูงในสภาวะควบคุมความดันก็ตาม

อย่างไรก็ตาม หมู่ดังกล่าวได้รับการรายงานว่าเป็นสัญญาณอันเกิดจากการสั่นสะเทือนของอินทรีย์สาร ได้เช่นเดียวกัน (Coman et al., 2007) โดยเฉพาะสัญญาณที่มาจากการยืดหดของพันธะระหว่างคาร์บอนและ ไฮโดรเจน (C-H stretching) โดยที่สัญญาณที่ปรากฏที่หมายเลขคลื่น 1451.32 เป็นสัญญาณจากหมู่ CH_3 ส่วนสัญญาณที่หมายเลขคลื่น 1418.40 มาจากหมู่ CH_2 ผลการตรวจพบสัญญาณในช่วงดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าผงกระดูกดังกล่าวไม่ได้ประกอบไปด้วยแร่ธาตุเพียงอย่างเดียวแต่น่าจะประกอบไปด้วยอินทรีย์สาร เช่นเดียวกัน นอกจากนี้สัญญาณการสั่นสะเทือนของโมเลกุลของอินทรีย์สารก็ถูกพบที่หมายเลขคลื่น 2956.04 และ 2923.07 สำหรับผงกระดูกต้มน้ำและต้มต่าง ตามลำดับ การพบสัญญาณดังกล่าวเป็นเครื่อง ยืนยันว่าในตัวอย่างมีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบ ข้อมูลดังกล่าวยังถูกยืนยันด้วยผลวิเคราะห์องค์ประกอบ ทางเคมี (ตารางที่ 6 และ 7) ที่พบว่าในผงกระดูกมีอินทรีย์สารที่เป็นโปรตีนและไขมันไม่ว่าตัวอย่างนั้นจะผ่าน การต้มน้ำหรือต้มต่างก็ตาม

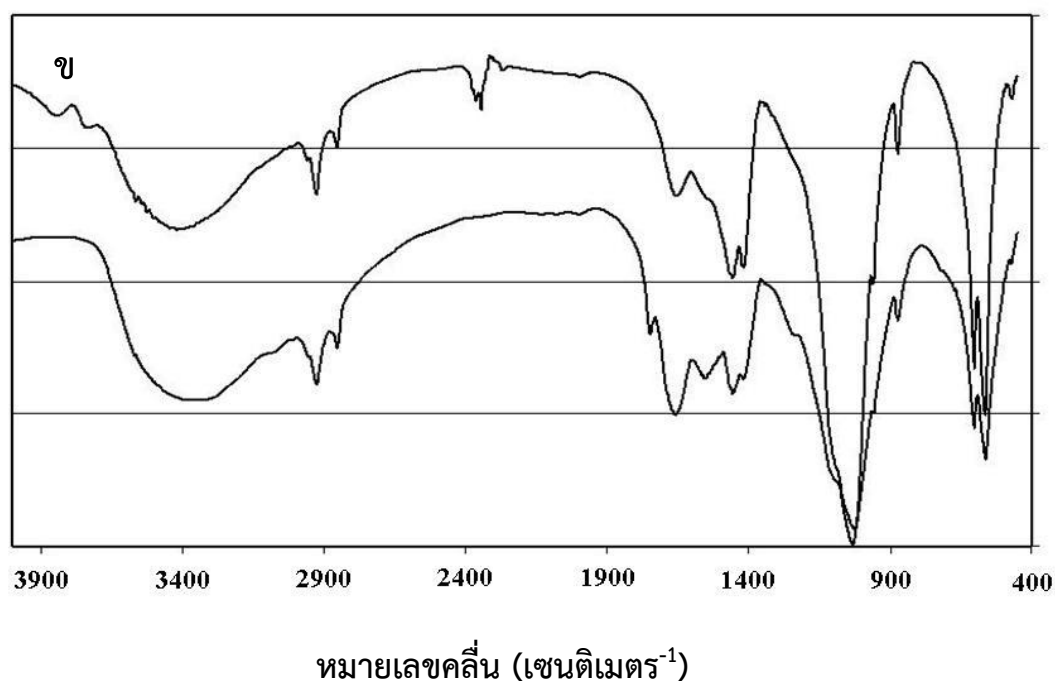
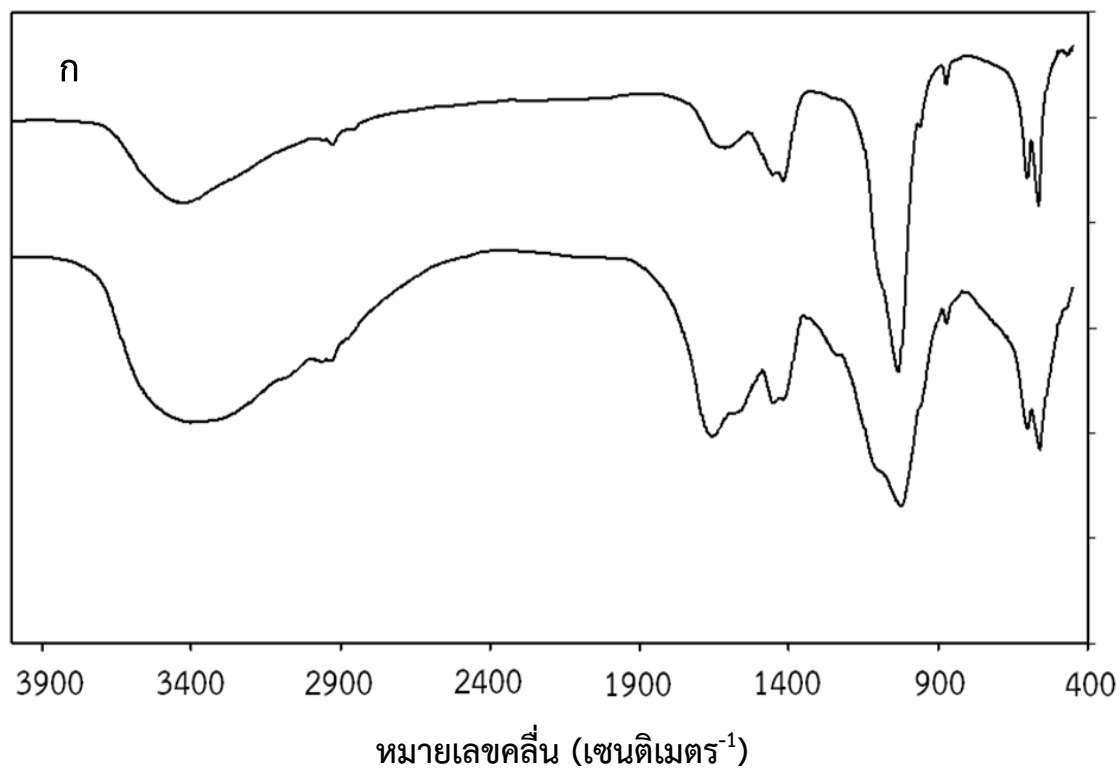
ข้อมูลที่ได้จากสัญญาณของคลื่นรังสีอินฟราเรดสื่อให้เห็นว่าผงกระดูกที่ผ่านการต้มน้ำและต้มต่างมี โครงสร้างทางเคมีที่แทบจะไม่แตกต่างกันเลย การต้มน้ำหรือต้มต่างไม่ทำให้เกิดการดัดแปรโครงสร้างทางเคมีของ กระดูก ดังนั้นการต้มต่างนอกจากจะช่วยกำจัดสารประกอบอินทรีย์ออกจากกระดูกปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังไม่ทำลายโครงสร้างของกระดูกเลย ดังนั้นการที่ผงกระดูกที่ได้จากการต้มต่างสามารถดูด ความชื้นได้มากกว่ากระดูกที่ต้มน้ำนั้นก็ไม่น่าจะมีสาเหตุมาจากความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทาง เคมีของสารประกอบอินทรีย์แต่อย่างใด

ผลการประเมินโครงสร้างด้วย FT-IR สำหรับผงกระดูกปลานิล รูปที่ 3 ข กลับพบการเปลี่ยนแปลงของ สัญญาณการสั่นสะเทือนที่ 560 ต่อเซนติเมตร อันเป็นสัญญาณที่เกิดจาก $[(\text{PO}_4)]^{2-}$ นอกจากนี้ยังพบ สัญญาณการยืดหดของหมู่ O-H (O-H stretching) ที่ 3,423 ต่อเซนติเมตร ซึ่งการพบหมู่ดังกล่าวก็สะท้อนให้เห็นว่ามีองค์ประกอบที่เป็นแอฟฟาไทท์ในกระดูก สัญญาณของหมู่อินทรีย์ก็ถูกตรวจพบเช่นกันกับผงกระดูก จากปลาเกล็ดเงิน อย่างไรก็ตามสัญญาณที่ 2,340 ถูกตรวจพบเฉพาะในผงกระดูกปลานิลที่ผ่านการบำบัดด้วย ต่างแต่ไม่พบในตัวอย่างที่บำบัดด้วยน้ำ ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้ต่างสามารถทำลายพันธะของ สารอินทรีย์ได้ดีจึงทำให้สามารถถูกกำจัดออกได้มากกว่าการใช้น้ำ เมื่ออินทรีย์สารถูกกำจัดออกมากจึงทำให้ สัดส่วนของแร่ธาตุมีมากขึ้นเช่นเดียวกับที่พบในกระดูกปลาเกล็ดเงิน

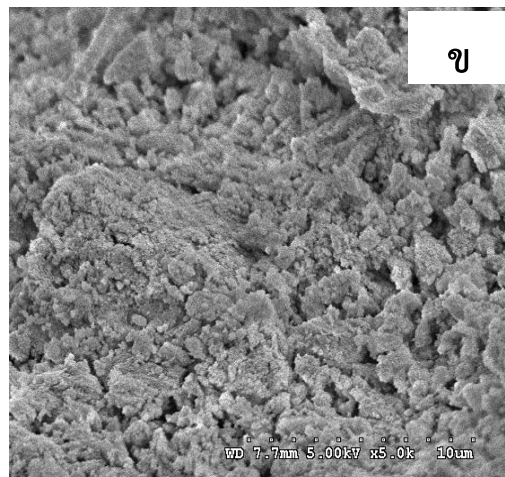
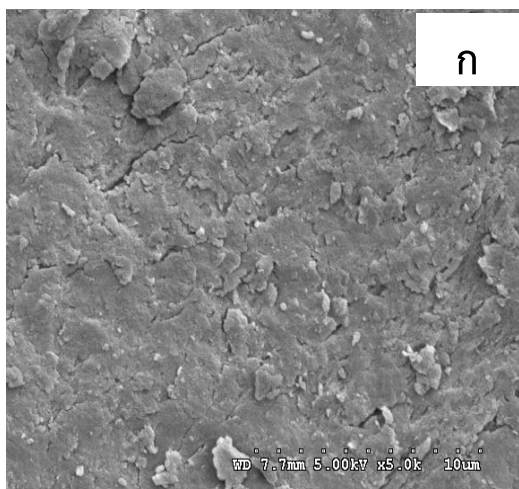
4.1.1.4 ภาพถ่ายจุลทรรศน์แบบส่องกราด

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscopy) เป็นข้อมูลที่เปิด โอกาสให้ทราบถึงรูปร่างของผงกระดูกที่เตรียมได้นอกจากนั้นยังเห็นรายละเอียดอันเกี่ยวข้องกับพื้นผิวของผง กระดูกอันเกิดจากการต้มในสารละลายที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาถึงพื้นผิวของอนุภาคผงกระดูกอย่างละเอียด ตามภาพถ่ายที่มีกำลังขยาย 3000 เท่าจะพบว่าอนุภาคของกระดูกปลาเกล็ดเงินและปลานิลที่ได้จากการต้มน้ำ จะมีพื้นผิวที่เนียนเรียบ โครงสร้างค่อนข้างแน่นหนา แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกระดูกที่ได้จากการต้มต่างจะ พบว่าพื้นผิวมีความขรุขระ แสดงให้เห็นการผุกร่อนของพื้นผิวอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4 และ 5) การที่พื้นผิวผุ กร่อนเช่นนั้นน่าจะเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารละลายต่างระหว่างต้มตัวอย่าง โดยสารละลายต่างเหล่านั้น จะไปละลายเอาคอลลาเจนที่รวมตัวกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับแอฟฟาไทท์ทำให้เกิดการชะล้างเอา คอลลาเจนออกมาจากแอฟฟาไทท์ทำให้ความหนาแน่นของส่วนประกอบในกระดูกลดลงพื้นผิวจึงเกิดเป็นรูป พรุน การที่พื้นผิวของอนุภาคมีความผุกร่อนทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่าน

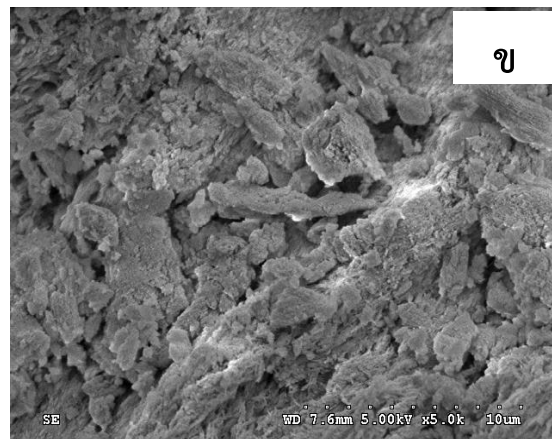
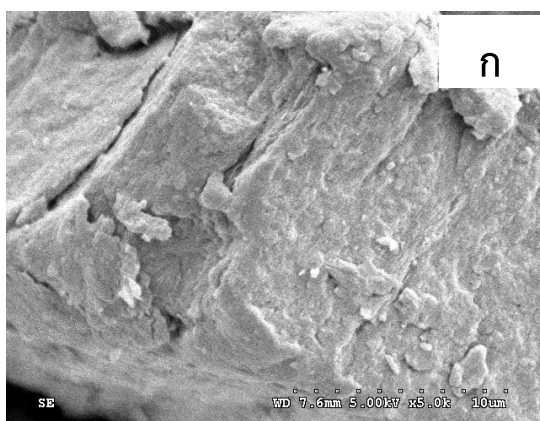
การต้มน้ำ พื้นผิวที่เพิ่มขึ้นมาเหล่านี้อาจก่อให้เกิดการดูดความชื้นได้มากกว่า ซึ่งเหตุดังกล่าวอาจใช้เป็นอธิบายถึงการตรวจพบความชื้นในตัวอย่างผงกระดูกที่ผ่านการต้มต่างที่มากกว่าผงกระดูกที่ผ่านการต้มน้ำทั้งๆที่การดูดน้ำนั้นไม่ได้มีสาเหตุมาจากการดูดน้ำของสารประกอบอินทรีย์และก็ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีแต่อย่างใด



รูปที่ 3 FT-IR spectra ของผงกระดูกปลาเกล็ดเงิน (ก) และปลานิล (ข) ที่ได้จากการต้มน้ำ (ล่าง) และต่าง (บน)



รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของผงกระดูกปลาเกล็ดเงินที่เตรียมได้จากการต้มน้ำ (ก) และสารละลายต่าง (ข) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

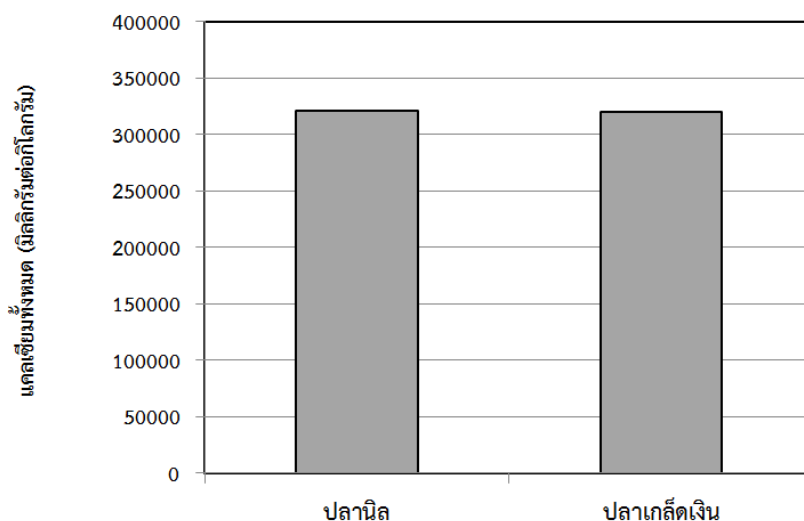


รูปที่ 5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของผงกระดูกปลานิลที่เตรียมได้จากการต้มน้ำ (ก) และต่าง (ข) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

4.1.1.5 ปริมาณแคลเซียม

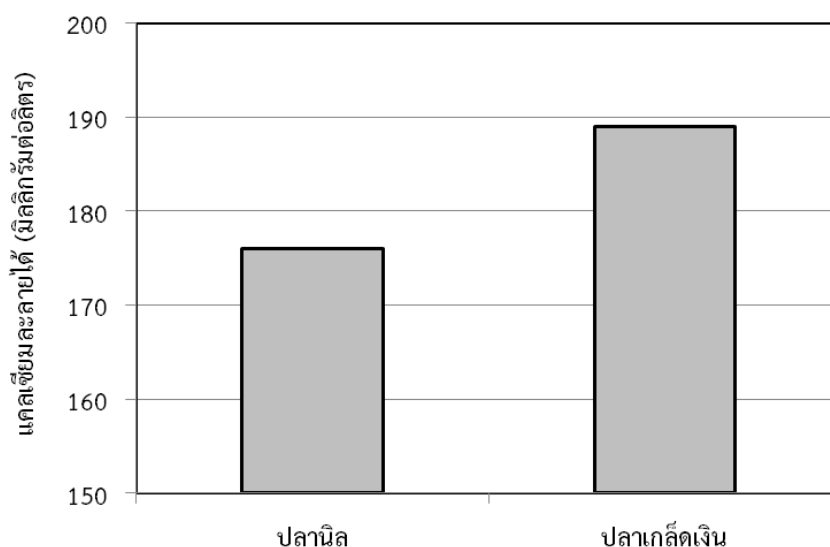
ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดและแคลเซียมละลายได้ที่พบในกระดูกปลาทั้งสองชนิดที่ผ่านกระบวนการกำจัดเนื้อด้วยต่างได้ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES โดยวิเคราะห์ทั้งปริมาณแคลเซียมทั้งหมดที่พบในผงกระดูกและปริมาณแคลเซียมละลายได้ที่ละลายออกมาด้วยน้ำเมื่อควบคุมสถานะในการสกัดด้วยน้ำให้เหมือนกันสำหรับผงกระดูกทั้ง 2 ชนิด ผลจากการวิเคราะห์แสดงได้ดังรูปที่ 6 ซึ่งพบว่าปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในปลาเกล็ดเงินและปลานิลมีค่า 320,200 และ 321,100 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในตัวอย่างทั้งคู่คิดเป็นร้อยละ 32.02 และ 32.11 สำหรับปลานิลและปลาเกล็ดเงินตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณแคลเซียมมีค่าน้อยกว่าปริมาณเถ้าทั้งหมดเป็นอย่างมาก ข้อมูลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าปริมาณธาตุที่อยู่ในผงกระดูกไม่ได้มีแต่เพียงแคลเซียมเท่านั้นหากแต่มีอย่างอื่นอยู่ด้วย ซึ่งก็ตรงกับรายงานที่ชี้ให้เห็นว่าแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกนอกจากจะมีแคลเซียมแล้วยังมีฟอสฟอรัส โซเดียม

และคลอรีน อย่างไรก็ตามปริมาณแคลเซียมที่พบก็ถือว่ามีความสูง ดังนั้นผงกระดูกที่เตรียมได้ก็น่าจะเป็นแหล่งของแคลเซียมธรรมชาติได้ดี



รูปที่ 6 ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในผงกระดูกปลานิลและปลาเกล็ดเงินที่เตรียมได้จากการต้มด้วยสารละลายต่าง

อย่างไรก็ตาม การนำแคลเซียมไปใช้ประโยชน์ในปฏิกิริยาทางชีวเคมีในร่างกายคนเราหรือแม้กระทั่งในการพัฒนาผลิตภัณฑ์นั้นแคลเซียมจะต้องอยู่ในรูปของแคลเซียมละลาย ดังนั้นปริมาณแคลเซียมทั้งหมดที่พบในกระดูกนั้นจะเป็นแคลเซียมที่ละลายมากน้อยเพียงใดจึงควรได้รับการศึกษา ดังนั้นเมื่อนำผงกระดูกไปละลายน้ำที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยควบคุมสัดส่วนของผงกระดูกและน้ำเป็น 1: 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณแคลเซียมซึ่งพบว่ามีความเข้มข้น 178 และ 189 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงได้ในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ปริมาณแคลเซียมละลายได้จากผงกระดูกปลานิลและปลาเกล็ดเงินที่เตรียมได้จากการต้มด้วยสารละลายต่างเมื่อละลายน้ำด้วยสัดส่วน 1:4

ผลจาก **รูปที่ 7** สะท้อนให้เห็นว่าถึงแม้ว่าในกระดุกจะมีแคลเซียมค่อนข้างมากแต่แคลเซียมส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของสารประกอบที่ไม่ละลายทำให้ยากต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ถึงแม้ว่าความสามารถในการละลายของแคลเซียมจากผงกระดุกจะมีค่าต่ำซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นประมาณ 4 มิลลิโมลาร์ นอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าปริมาณแคลเซียมในกระดุกปลาเกล็ดเงินสามารถถูกละลายได้ด้วยน้ำได้ดีกว่าปลานิล ดังนั้นการนำกระดุกปลาเกล็ดเงินในรูปผงไปใช้ประโยชน์โดยตรงน่าจะเป็นไปได้มากกว่าปลานิลเนื่องจากปลานิลมีสัดส่วนของแคลเซียมที่ละลายออกมาได้น้อยกว่า

ผลการค้นพบดังกล่าวนำมาซึ่งแนวทางการใช้ประโยชน์ผงกระดุกจากปลาเกล็ดเงินโดยตรงในรูปแบบของการเป็นสารเติมแต่งในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อมุ่งหวังให้เกิดสมบัติเชิงหน้าที่พร้อมๆกับเป็นการเพิ่มปริมาณแคลเซียมในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวทดลองในตอนี่ 2

สำหรับผงกระดุกที่ได้จากปลานิลนั้นหากต้องการนำไปใช้ประโยชน์ควรได้รับการสกัดแคลเซียมออกมาอยู่ในรูปของสารละลายให้ได้มากขึ้นเสียก่อนมิเช่นนั้นแคลเซียมที่มีอยู่ในกระดุกก็อาจจะทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ ดังนั้นการสกัดแคลเซียมจากปลานิลด้วยกรดจึงได้รับการศึกษาต่อไป

4.1.2 การสกัดแคลเซียมจากกระดุกปลานิลด้วยกรด

4.1.2.1 ผลของชนิดกรด

การสกัดแคลเซียมจากกระดุกปลานิลด้วยกรด 5 ชนิดได้รับการศึกษาโดยกรดเหล่านั้นจัดเป็นกรดแก่คือ กรดเกลือ กรดกำมะถัน และกรดไนตริก ส่วนกรดอ่อนได้แก่ กรดน้ำส้มและกรดมะนาว ผลจากการศึกษาพบว่ากรดทุกชนิดมีฤทธิ์ในการสกัดแคลเซียมออกมาทั้งนั้น โดยการสกัดดังกล่าวอาจเกิดเนื่องมาจากกรดไปทำลายโครงสร้างทำให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมอิสระออกมา ทั้งนี้กรดกำมะถันและกรดน้ำส้มพบว่ามีฤทธิ์ในการสกัดแคลเซียมที่ใกล้เคียงกัน (**ตารางที่ 10**) กรดกำมะถันแม้จะมีประสิทธิภาพในการสกัดแคลเซียมได้ดีแต่ก็อาจมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้ในระบบอาหาร ในขณะที่กรดน้ำส้มที่มีความสามารถในการสกัดใกล้เคียงกันแต่สามารถประยุกต์ใช้ในอาหารได้ง่ายกว่าเพราะใช้ในรูปแบบของน้ำส้มสายชูอยู่แล้ว ดังนั้นกรดน้ำส้มสายชูจึงได้รับการเลือกให้เป็นกรดชนิดที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแคลเซียมจากกระดุกปลานิล

ตารางที่ 10 ความสามารถในการสกัดแคลเซียมจากกระดุกปลานิลด้วยกรดชนิดต่างๆ

ชนิดกรด	ความสามารถในการสกัดเมื่อเทียบกับค่าสูงสุด (Normalized extractability, %)
กรดกำมะถัน	63.16±0.24 ^{bc}
กรดเกลือ	98.21±0.32 ^a
กรดไนตริก	71.80±0.31 ^b
กรดน้ำส้มสายชู	100.00±0.43 ^a
กรดมะนาว	60.65±0.41 ^{bc}

ตัวอักษรที่แตกต่างกันของแต่ละแถวแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.1.2.2 ผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติก

เมื่อกรดน้ำส้มสายชูได้รับเลือกให้เป็นกรดที่มีความเหมาะสมต่อการสกัดแล้วก็ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยแปรความเข้มข้นตั้งแต่ 0.03 ถึง 1.00 โมลาร์ ผลจากการศึกษาพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของกรดน้ำส้มสายชูทำให้ค่าความสามารถในการสกัดแคลเซียมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ (**ตารางที่ 11**) หลังจากนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของกรดไม่ทำให้ความสามารถในการสกัดเพิ่มขึ้นได้แต่อย่างใด ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสกัดแคลเซียมจากกระดูกปลานิลจึงได้รับเลือกที่ 0.25 โมลาร์

ตารางที่ 11 ความสามารถในการสกัดแคลเซียมจากกระดูกปลานิลด้วยกรดชนิดต่างๆ

ความเข้มข้นกรดอะซิติก (โมลาร์)	ความสามารถในการสกัดเมื่อเทียบกับค่าสูงสุด (Normalized extractability, %)
0.03	51.80±0.21 ^d
0.06	79.11±0.32 ^{bc}
0.12	86.91±0.73 ^b
0.25	100.00±1.04 ^a
0.50	79.40±0.83 ^{bc}
1.00	91.47±0.41 ^b

ตัวอักษรที่แตกต่างกันของแต่ละแถวแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.1.2.3 ผลของเวลา

การเพิ่มเวลาในการสกัดก็ทำให้ความสามารถในการสกัดเพิ่มมากขึ้นตามลำดับดังจะเห็นได้ว่าการสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำให้ได้ค่าความสามารถในการสกัดมากที่สุด (ตารางที่ 12) แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดเป็น 72 ชั่วโมงกลับพบว่าประสิทธิภาพในการสกัดก็ไม่ได้เพิ่มมากขึ้นอีกแสดงให้เห็นว่าจุดอิ่มตัวของ การสกัดเริ่มมาถึงตั้งแต่ตอนใช้เวลาในการสกัดเป็น 48 ชั่วโมง ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมต่อการสกัดจึงถูกเลือกที่ 48 ชั่วโมงถึงแม้ว่าการสกัดที่ 72 ชั่วโมงจะทำให้ความสามารถในการสกัดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยก็ตาม อนึ่งการสกัดด้วยระยะเวลาที่นานเกินไปที่อุณหภูมิห้องอาจก่อให้เกิดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มที่ทนกรดเนื่องจากในผงกระดูกมีทั้งโปรตีนและไขมัน ดังนั้นการเลือกระยะเวลาที่สั้นลงแต่ยังคงประสิทธิภาพในการสกัดที่ใกล้เคียงจึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดี

ผลจากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าควรสกัดแคลเซียมจากผงกระดูกปลานิลที่เตรียมได้จากการต้มต่าง ด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นสภาวะดังกล่าวจึงได้ถูกนำไปใช้ในการสกัดแคลเซียมโดยควบคุมสัดส่วนในการสกัดเป็น 1:20 พบว่ามีปริมาณแคลเซียมในส่วนที่ละลายได้ถึง 2,376 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่าดังกล่าวมีค่ามากกว่าการละลายที่เกิดจากน้ำถึง 13 เท่า ทั้งๆที่การสกัดด้วยกรดใช้สัดส่วนของผงกระดูกน้อยกว่าน้ำถึง 5 เท่า

ดังนั้นหากต้องการนำแคลเซียมจากผงกระดูกปลานิลไปใช้ประโยชน์ไม่ว่าจะเป็นประโยชน์เชิงชีวเคมีหรือประโยชน์ต่อการสร้างสมบัติเชิงหน้าที่ควรจะทำการสกัดแคลเซียมด้วยกรดอะซิติกเสียก่อน

4.1.3 สรุป

จากการศึกษากระบวนการเตรียมผงกระดูกโดยแปรสารละลายที่ใช้ในการต้มเพื่อกำจัดเศษเนื้อและอินทรีย์สารอื่นๆที่ติดอยู่กับก้างด้วยการต้มน้ำและการต้มต่าง ผลจากการศึกษาพบว่าการใช้สารละลายต่างต้มจะช่วยกำจัดอินทรีย์สารออกจากกระดูกปลาได้มากกว่านำมาซึ่งความบริสุทธิ์ของส่วนที่เป็นแร่ธาตุและผลผลิตของแร่ธาตุที่สูงขึ้น เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีพบว่าการต้มต่างไม่ได้ทำลายโครงสร้างทางเคมีของกระดูก แต่สารละลายต่างจะไปละลายโปรตีนในเนื้อกระดูกทำให้เกิดการกัดกร่อนและพื้นผิวมีรูพรุนมากขึ้น การเพิ่มพื้นที่ผิวของกระดูกดังกล่าวทำให้ผงกระดูกดูดความชื้นได้มากกว่าอันที่เดิมต่างเพียงเล็กน้อย แต่พื้นที่ผิวที่เพิ่มขึ้นอาจเอื้อประโยชน์ต่อการชะเอาแร่ธาตุออกมาโดยเฉพาะแคลเซียม นอกจากนั้นสีของผงกระดูกที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างและน้ำพบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยผงกระดูกที่ได้จากการเตรียมด้วยต่างจะมีสีคล้ำมากขึ้นเนื่องจากความเป็นสีเหลืองและสีแดงมากขึ้น

ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดที่พบในกระดูกปลาเกล็ดเงินและปลานิลพบว่ามีประมาณร้อยละ 32 ทำให้เป็นแหล่งของแร่ธาตุที่ดี แต่แคลเซียมที่ละลายได้พบว่ามีค่าน้อยมากคือประมาณร้อยละ 0.6 แต่แคลเซียมละลายได้จากผงกระดูกปลาเกล็ดเงินมีค่ามากกว่าปลานิลแสดงให้เห็นว่าการนำผงกระดูกปลาเกล็ดเงินไปใช้โดยตรงมีความเป็นไปได้

การใช้ประโยชน์แคลเซียมจากผงกระดูกปลานิลควรได้รับการสกัดเสียก่อน ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดพบว่าควรสกัดแคลเซียมจากกระดูกปลานิลด้วยกรดอะซิติก ที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะการสกัดดังกล่าวทำให้ได้แคลเซียมละลายได้เพิ่มขึ้นเป็น 13 เท่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำในการสกัด

4.2 ตอนที่ 2: ผลของผงกระดูกปลาเกล็ดเงินต่อคุณภาพไส้กรอกปลาเกล็ดเงิน

4.2.1 กิจกรรมทรานสกลูตามิเนสที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้

สารละลายแคลเซียมที่ได้จากผงกระดูกปลาเกล็ดเงินขนาดน้อยกว่า 38 ไมโครเมตรที่ผ่านการเขย่าผสมกับน้ำด้วยสัดส่วนกระดูกต่อน้ำที่ 1:4 ที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ที่มีแคลเซียมละลายได้อยู่ที่ความเข้มข้นประมาณ 4 มิลลิโมลาร์ได้ถูกนำไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสอย่างหยาบ (Crude transglutaminase) ที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อปลาเกล็ดเงินจึงได้รับการตรวจสอบ โดยใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์เพราะทำให้ง่ายต่อการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากเอมีนสังเคราะห์ (Synthetic amine) ที่ใช้มีความสามารถในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ได้ เมื่อเอมีนดังกล่าวถูกรวมเข้า (Incorporate) ไปในโปรตีนจะทำให้สภาพแวดล้อมรอบๆโมเลกุลเปลี่ยนจากมีขั้วมากเป็นมีขั้วน้อยลง ส่งผลให้ค่าความยาวคลื่นที่ก่อให้เกิดการเรืองแสงสูงสุด (λ_{max}) เปลี่ยนไปในทิศทางสีน้ำเงิน (Blue shift) และในระบบการตรวจวัดกิจกรรมของ ทรานสกลูตามิเนสพบว่าค่า (λ_{max} อยู่ที่ 480 นาโนเมตรเมื่อให้พลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในสารสกัดจากกล้ามเนื้อปลาจะเป็นเครื่องพิสูจน์ว่าในกล้ามเนื้อปลานชนิดนี้มีเอนไซม์นั้นอยู่ เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาจะพบว่าการกระตุ้นสารสกัดเอนไซม์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1000 นาโนโมลาร์ ทำให้ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์คิดเป็น 25.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Unit/mL) (รูปที่ 8) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่เติมแคลเซียมเลยกลับไม่พบกิจกรรมผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าในกล้ามเนื้อปลาเกล็ดเงินนั้นมีเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส นอกจากนั้นเอนไซม์ดังกล่าวก็ต้องการแคลเซียมไอออนในการกระตุ้นการทำงาน (Ca-dependent enzyme) เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในปลาถูกตรวจพบหลายชนิด (Binsi and Shamasundar, 2012; Hemung et al., 2005)

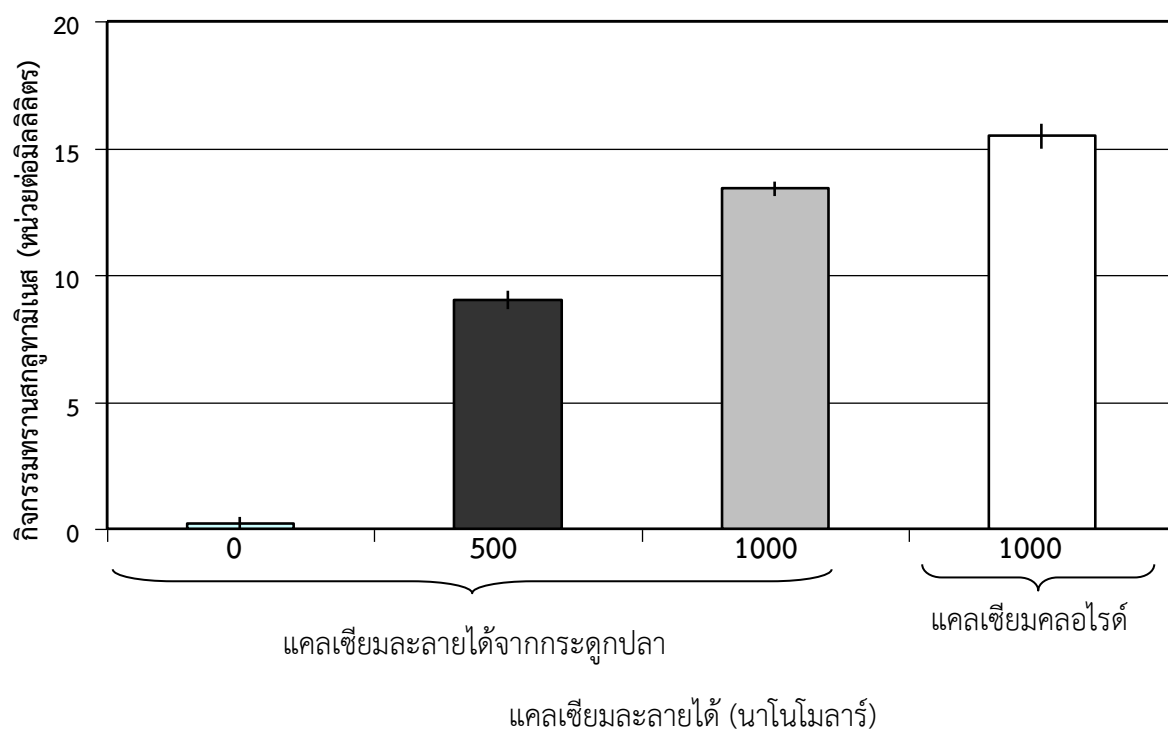
เมื่อพิจารณากิจกรรมที่เกิดขึ้นพบว่ามีความน้อยกว่ากิจกรรมที่พบในซูริมิที่ผลิตจากปลา Alaska Pollock (Yin and Park, 2014) นอกจากนั้นยังน้อยกว่าที่พบในกล้ามเนื้อปลานิลดั่งที่ปรากฏในรายงานที่ผ่านมา (Worratao and Yongsawatdigul, 2005) กิจกรรมที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากระบบการตรวจสอบกิจกรรมที่ใช้สารตั้งต้นและวิธีการตรวจวัดที่ไม่เหมือนกัน นอกจากนั้นปริมาณและกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสก็พบว่ามีความแปรผันตามแหล่งที่พบด้วย อย่างไรก็ตามปริมาณที่พบในกล้ามเนื้อปลาเกล็ดเงินก็น่าจะเพียงพอในการทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้จากผงกระดูกปลาเกล็ดเงิน

เมื่อพิจารณากิจกรรมของทรานสกลูตามิเนสในสภาวะที่มีการเติมแคลเซียมละลายได้จากผงกระดูกให้ถึงความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration) 500 และ 1000 นาโนโมลาร์ (nM) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ถูกตรวจพบที่ 9.02 และ 21.40 หน่วยต่อมิลลิลิตรของเอนไซม์ และเมื่อเทียบกับการเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) เนื่องแคลเซียมคลอไรด์ถูกรายงานว่าเป็นแหล่งของแคลเซียมที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆรวมทั้งทรานสกลูตามิเนสด้วย (Yasueda et al., 1994) เนื่องจากแคลเซียมจะไปเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลเอนไซม์ทำให้หมู่บดบังเปิดตัวออกจึงทำให้สารตั้งต้นสามารถเข้าถึงหมู่เร่งปฏิกิริยา (Catalytic residue) จึงทำให้เกิดปฏิกิริยา นอกจากนั้นปริมาณแคลเซียมที่เพียงพอต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จากแต่ละแหล่งก็มีค่าแตกต่างกันโดยเอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อปลานิลพบว่าการเติมแคลเซียมเพียง 1 มิลลิโมลาร์ในการกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ (Worratao and Yongsawatdigul, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับพฤติกรรมของเอนไซม์จากตับปลา Treadfin bream ที่พบว่าการเติมแคลเซียมมากกว่า 1 มิลลิโมลาร์ไม่ก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมแต่อย่างใด (Hemung and Yongsawatdigul, 2008) อย่างไรก็ตาม Binsi and Shamasudhar

(2012) กลับพบว่าเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากปลา Common carp และ Snapper กลับมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นความต้องการแคลเซียมของเอนไซม์อาจขึ้นอยู่กับระดับความบริสุทธิ์ด้วย โดยเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะต้องการแคลเซียมเพียงเล็กน้อยในการกระตุ้นให้โครงร่างเกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา

ผลจากการศึกษาพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่กระตุ้นด้วยสารสกัดแคลเซียมจากกระดูกมีค่าน้อยกว่าการใช้แคลเซียมคลอไรด์เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นเท่ากัน (1000 นาโนโมลาร์) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในสารสกัดของผงกระดูกน่าจะมีสารประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีนและไขมันที่ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา เช่น ไขมันและโปรตีน การมีสารดังกล่าวปะปนในสารละลายกระดูกจะทำให้ความบริสุทธิ์ของระบบการวิเคราะห์ลดลงกิจกรรมของเอนไซม์จึงเกิดได้ไม่เต็มศักยภาพ

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมละลายได้จากกระดูกปลาสามารถกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูตามิเนสได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการเติมผงกระดูกลงในไส้กรอกโดยตรงจะทำให้แคลเซียมในผงกระดูกละลายออกมาและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในกล้ามเนื้อปลาได้ ดังนั้นการเชื่อมข้ามของโปรตีนด้วยเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในกล้ามเนื้อ (Indigeneus transglutaminase) ที่กระตุ้นด้วยสารละลายแคลเซียมที่สกัดจากผงกระดูกปลาจึงได้รับการทดสอบ



รูปที่ 8 กิจกรรมของทรานสกลูตามิเนสอย่างหยาบจากปลาเกล็ดเงินที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมละลายได้จากผงกระดูกปลาและแคลเซียมคลอไรด์

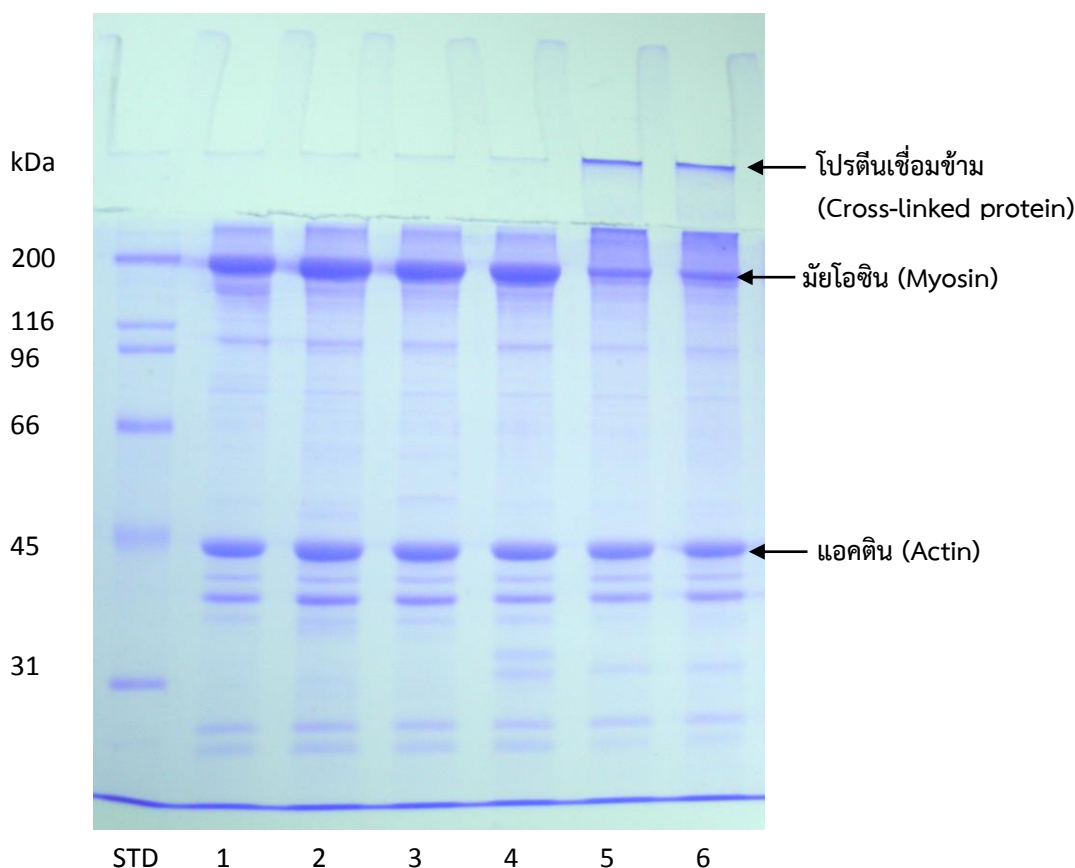
4.2.2 การเชื่อมข้ามโปรตีนด้วยทรานสกลูทามิเนสและแคลเซียมละลายได้

การเชื่อมข้ามโปรตีนได้ถูกตรวจสอบโดยใช้แคลเซียมละลายได้มากระตุ้นการทำงานของทรานสกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลาเองโดยควบคุมระบบให้ใกล้เคียงกับระบบที่จะใช้ในการผลิตไส้กรอกให้มากที่สุด ดังนั้นเกลือจึงถูกเติมลงไปคิดเป็นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก จากนั้นบดผสมกับแคลเซียมและนำไปต้มในสภาวะที่ใช้ในการ Setting ตัวอย่างคือ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปละลายโดยบดผสมกับสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเพื่อให้โปรตีนทั้งหมดละลาย เก็บโปรตีนละลายได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงแล้วนำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปแยกด้วยเทคนิคการแยกสารในสนามไฟฟ้าบนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ ที่เรียกว่า โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Poly acrylamide gel electrophoresis, PAGE) แบบที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพอย่างสมบูรณ์แบบ (Denatured PAGE) ในสภาวะที่มีการเติมสารรีดิวซ์ (Reducing agent) และการให้ความร้อนกับตัวอย่าง โดยควบคุมปริมาณโปรตีนในตัวอย่างให้เท่ากันที่ 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แลบบโปรตีนที่ได้จากการแยกจะถูกวิเคราะห์หาชนิดและขนาดของโปรตีนเทียบกับโปรตีนมาตรฐานขนาดต่างๆ

ผลจากการศึกษาพบว่าเมื่อโปรตีนถูกต้มในสภาวะที่ไม่มีการเติมแคลเซียมพบว่าโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างหลักจะเป็นมัยโอซินเส้นหนัก (Myosin heavy chain, MHC) ที่มีขนาดประมาณ 200 กิโลดาลตัน (รูปที่ 9) รองลงมาเป็นแอคติน (Actin) ด้วยขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน และโปรตีนอื่นๆ เช่น ไทรโอมัยโอซิน และมัยโอซินเส้นเบา (Myosin light chains) ก็ถูกตรวจพบที่ขนาดประมาณ 21-35 กิโลดาลตัน แต่ไม่พบว่ามีปรากฏตัวของโปรตีนขนาดใหญ่ติดค้างอยู่ส่วนบนของเจล (Stacking gel) และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างโปรตีนที่ต้มในสภาวะเดียวกันแต่มีการเติมแคลเซียมละลายได้กลับพบว่าโปรตีนขนาดใหญ่ติดค้างอยู่บน Stacking gel พร้อมๆกับการหายไปของแถบมัยโอซินอย่างเห็นได้ชัด แต่โปรตีนอื่นๆ แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแถบ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมที่เติมลงไปในระบบมีปริมาณเพียงพอที่จะกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูทามิเนสที่หลงเหลือในกล้ามเนื้อปลาทำให้เกิดการเชื่อมข้ามกันของโปรตีนในเนื้อปลา นอกจากนั้นโปรตีนที่เป็นเป้าหมายหลักของทรานสกลูทามิเนสเหมือนจะเป็นมัยโอซินเส้นหนักเนื่องจากได้หายไปทันที แล้วไปปรากฏตัวเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเพราะมัยโอซินเส้นหนักได้เชื่อมข้ามกัน ที่ผ่านมากก็มีรายงานว่ามัยโอซินเส้นหนักในโปรตีนกล้ามเนื้อเป็นสารตั้งต้นชนิดโปรด (Favorite substrate) สำหรับทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดงโดยบริเวณที่ถูกทำปฏิกิริยามักจะได้รับรายงานว่าเป็นส่วนหางของโมเลกุล (Hemung et al., 2008) ทั้งนี้เพราะโครงสร้างในส่วนหางเป็นแบบเกลียวจึงง่ายต่อการเข้าถึงของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าลำดับกรดอะมิโนบริเวณหางของมัยโอซินเส้นหนักก็มีความจำเพาะเจาะจงต่อการเชื่อมข้ามที่เร่งด้วยทรานสกลูทามิเนส เนื่องจากมัยโอซินเป็นโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในกล้ามเนื้อโดยคิดเป็นร้อยละประมาณ 40-60 ดังนั้นหากการเชื่อมข้ามเกิดขึ้นกับโปรตีนดังกล่าวแม้เพียงเล็กน้อยก็น่าจะเพียงพอสำหรับการส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสของโปรตีนเจลหรืออิมัลชันเจลที่เกิดจากโปรตีนปลาได้

ในขณะเดียวกันโปรตีนแอคตินกลับไม่พบว่าถูกเชื่อมข้ามแต่อย่างใด ทั้งนี้ก็มีรายงานอีกว่าโครงสร้างของแอคตินมีความกระชับ (Compact) เกินไปและยากที่ทรานสกลูทามิเนสจะเข้าถึงจึงไม่ถูกเร่งปฏิกิริยา นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าชนิดและลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ในโปรตีนแอคตินก็ไม่มี ความจำเพาะเจาะจงต่อการเชื่อมข้ามที่เร่งด้วยทรานสกลูทามิเนส

การเชื่อมข้ามของโปรตีนมัยโอซินด้วยเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสจากปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมจากผงกระดูกปลาได้รับการยืนยันมาแล้วโดย Tao and Park (2014) และพบว่าทำให้ผงกระดูกมีขนาดเล็กกระตุ้นนาโนเมตรจะทำให้ปริมาณแคลเซียมถูกปลดปล่อยออกมามากกว่าขึ้นทำให้กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่ากระดูกที่มีขนาดใหญ่ระดับไมโครเมตร



รูปที่ 9 แบบแผนของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาที่บ่มในสภาวะที่มีและไม่มีแคลเซียมละลายได้

STD = โปรตีนมาตรฐาน

1 และ 2 = โปรตีนสกัดที่ไม่ผ่านการบ่ม

3 และ 4 = โปรตีนสกัดที่ผ่านการบ่มในสภาวะที่ไม่มีแคลเซียม

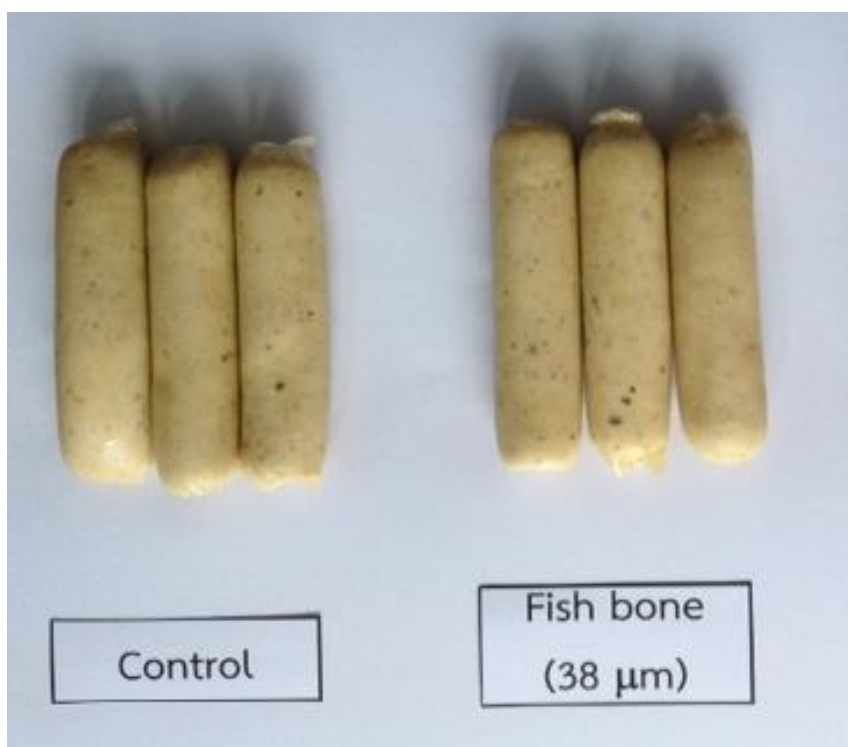
5 และ 6 = โปรตีนสกัดที่ผ่านการบ่มกับสารละลายแคลเซียมจากกระดูกปลา (1000 นาโนโมลาร์)

4.2.3 คุณภาพไส้กรอกปลา

ไส้กรอกอิมัลชันจากปลาได้รับการผลิตด้วยสูตรที่คล้ายกับโบโลญญา (Bologna) โดยควบคุมปริมาณส่วนประกอบตามที่ระบุในบทที่ 3 ทั้งนี้แบบจำลองของไส้กรอกที่ใช้เป็นแบบลดปริมาณไขมันโดยเติมสารทดแทนไขมันที่ผลิตจากเจลของผงบุกและคาราจีแนนผสมกัน ปริมาณเกลือถูกควบคุมที่ร้อยละ 2 ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อละลายแต่ก็ไม่มากเกินไปเพราะการมีเกลือมากกว่านี้อาจส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก็จริงแต่ปริมาณเกลือที่มากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคบางกลุ่มที่ต้องควบคุมปริมาณการบริโภคโซเดียม โดยเฉพาะคนที่เป็โรคความดันโลหิตสูงและคนที่เป็โรคหัวใจ ตีบตัน หรือแม้กระทั่งคนที่เป็โรคไต กระบวนการผลิตไส้กรอกถูกควบคุมให้อุณหภูมิไม่เกิน 12 องศาเซลเซียสทั้งนี้เพื่อรักษาสภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อให้อยู่ในสภาพดั้งเดิมมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ การที่โปรตีนยังมีเสถียรภาพระหว่างการสับผสมนั้นจะทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อละลายตัวได้ดีและเกิดสมบัติเชิงหน้าที่ในการห่อหุ้มเม็ดน้ำมัน (Oil droplet) ไว้ในโครงสร้างได้ดีทำให้เกิดระบบอิมัลชันที่มีเสถียรภาพ เมื่ออิมัลชันดังกล่าว

ได้รับความร้อนก็จะทำให้เกิดเป็นเจลที่ห่อหุ้มเม็ดไขมันไว้ในโครงสร้างอย่างสมบูรณ์นำมาซึ่งเนื้อสัมผัสและลักษณะปรากฏที่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค

ไส้กรอกอิมัลชันจากปลาจึงได้ถูกผลิตทั้งสูตรที่เติมผงแคลเซียมคิดเป็นร้อยละ 1 เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติม (ตัวอย่างควบคุม) เมื่อเตรียมส่วนผสมไส้กรอก (Sausage batter) ได้แล้วก็นำไปอัดใส่ในไส้พลาสติกและมัดเป็นท่อนใกล้เคียงกันก่อนนำไปให้บ่มที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ซึ่งสภาวะดังกล่าวได้รับรายงานว่าเหมาะต่อการทำงานของทรานสกลูทามิเนสจากปลาโดยเฉพาะจากปลาในแถบร้อน (Tropical fish) จากนั้นให้ความร้อนโดยการบ่มในอ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที กระบวนการดังกล่าวทำให้อุณหภูมิตรงกลางของท่อนไส้กรอกมีค่ามากกว่า 75 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นจุดที่ทำให้มันใจว่าโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาเกิดการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์หรืออาจเรียกได้ว่าเป็นสภาวะที่ใช้ในการทำไส้กรอกสุก (Cook condition) ไส้กรอกที่ได้จะถูกทำให้เย็นอย่างรวดเร็วก่อนเก็บในตู้เย็นไส้กรอกทำให้ได้ไส้กรอกดัง รูปที่ 10



รูปที่ 10 ไส้กรอกอิมัลชันจากปลาเงินที่เติมและไม่เติมผงกระดูกปลา

ไส้กรอกในรูปที่ 10 มีสีเหลืองครีมและเมื่อพิจารณาจากลักษณะภายนอกจะพบว่าทั้งสองตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันเลย ทั้งนี้เพราะว่าอนุภาคของผงกระดูกที่เติมลงไปมีขนาดเล็กเพียงพอ นอกจากนั้นสูตรในการผลิตไส้กรอกก็มีการเติมเครื่องเทศหลายอย่างลงไปทำให้ลักษณะปรากฏของทั้งสองสูตรไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งก็เป็นไปตามที่สันนิษฐานว่าเมื่อเติมผงกระดูกในระบบไส้กรอกปลาจะไม่ทำให้ลักษณะปรากฏเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้เพราะลักษณะปรากฏเป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อการตัดสินใจเลือกซื้อของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามคุณภาพด้านเคมี สมบัติทางเคมีกายภาพ และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสก็ควรได้รับการประเมินอย่างละเอียดเพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของไส้กรอกที่ได้จากทั้งสองสูตร

4.2.3.1 องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบอย่างหยาบของไส้กรอกปลาได้รับการวิเคราะห์หาความชื้น ไขมัน โปรตีน และปริมาณเถ้าดังแสดงในตารางที่ 12 ผลจากการศึกษาพบว่า การเติมผงแคลเซียมลงในสูตรไม่ทำให้ความชื้น ไขมัน และโปรตีนแตกต่างกันแต่อย่างใด (ตารางที่ 12) ถึงแม้ว่าจะพบโปรตีนและไขมันในผงกระดูกก็ตาม ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปริมาณที่เติมลงไปไม่ได้มากพอที่จะส่งผลต่อองค์ประกอบโดยรวม

ตารางที่ 12 องค์ประกอบทางเคมีของไส้กรอกอิมัลชันเสริมและไม่เสริมผงกระดูกปลา

องค์ประกอบ	สูตรไส้กรอก	
	ควบคุม	เสริมผงกระดูก
ความชื้น	67.38 ± 0.15 ^{ns}	66.74 ± 0.29 ^{ns}
โปรตีน	7.78 ± 0.27 ^{ns}	8.18 ± 0.29 ^{ns}
ไขมัน	13.47 ± 0.05 ^{ns}	13.82 ± 0.05 ^{ns}
เถ้าทั้งหมด	1.11 ± 0.10 ^b	1.77 ± 0.09 ^a

*a-b ที่เป็นตัวเลขยกกำลังแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาปริมาณเถ้าทั้งหมดของไส้กรอกกลับพบว่า มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อมีการเติมผงกระดูกลงไปร้อยละ 1 ข้อมูลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าไส้กรอกปลาที่มีปริมาณแร่ธาตุเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 60 แสดงว่าการเติมผงกระดูกมีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณแร่ธาตุให้กับไส้กรอกอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามแร่ธาตุดังกล่าวจะมีส่วนที่เป็นแคลเซียมเล็กน้อยเพียงใดก็ได้ทำการตรวจวัดปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในตัวอย่างไส้กรอกซึ่งพบว่าตัวอย่างไส้กรอกสูตรควบคุมและสูตรเสริมผงกระดูกมีแคลเซียมคิดเป็นร้อยละ (โดยน้ำหนักแห้ง) 0.079 และ 1.178 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าแร่ธาตุที่เพิ่มขึ้นในไส้กรอกสูตรเสริมผงกระดูกปลาเป็นธาตุแคลเซียมอยู่ด้วยโดยแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นคิดเป็น 15 เท่า เมื่อพิจารณาปริมาณแคลเซียมในตัวอย่างไส้กรอกที่ยังไม่ผ่านการอบแห้งพบว่า ไส้กรอกควบคุมและไส้กรอกเสริมกระดูกปลามีแคลเซียมคิดเป็นร้อยละ 0.025 และ 0.392 ตามลำดับ หรือคิดเป็น 25 และ 392 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ปริมาณแคลเซียมในสูตรไส้กรอกนี้ถือว่าเพิ่มขึ้นอย่างมากและมากพอที่จะเรียกไส้กรอกนี้ว่าเป็นไส้กรอกสูตรมีแคลเซียมสูง เนื่องจากการบริโภคไส้กรอกชนิดนี้เพียง 100 กรัมเทียบเท่าหนึ่งหน่วยบริโภค ก็ทำให้ได้ปริมาณแคลเซียมมากกว่าร้อยละ 20 ของปริมาณแคลเซียมที่ร่างกายควรได้รับตามที่ระบุในปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวันสำหรับคนไทย (Thai RDI) คือ 800 มิลลิกรัมต่อวัน ดังนั้นการเติมผงกระดูกในไส้กรอกปลาเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการส่งเสริมให้ไส้กรอกปลากลายเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพโดยจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีแคลเซียมสูง ซึ่งแคลเซียมที่ได้จากผงกระดูกปลาพบว่าสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ที่พบในระบบทางเดินอาหารดังที่ได้มีการทดลองในหลอดทดลองมาก่อนหน้านี้โดยใช้ผงกระดูกจากปลาตุก ปลาชาลมอน (Luu and Nguyen, 2009) นอกจากนั้น Malde et al, (2009) ยังได้พิสูจน์แล้วว่าผงกระดูกจากปลา Cod และ Salmon สามารถถูกดูดซึมได้เมื่อมีการทดลองโดยใช้ผู้ทดลองเป็นผู้ชายวัยหนุ่ม (Young healthy men) ดังนั้นการมีผงกระดูกและปริมาณแคลเซียมจากผงกระดูกในไส้กรอกปลาก็น่าจะเป็นแหล่งแคลเซียมให้กับผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี ทำให้ไส้กรอกที่ผลิตขึ้นจัดเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีแคลเซียมสูง

4.2.3.2 สี

ไส้กรอกที่ผลิตได้ถูกนำมาประเมินสีว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่เนื่องจากผงกระดุกที่ผลิตขึ้นจะมีสีค่อนข้างขาวเมื่อนำมาเติมในไส้กรอกจะก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของสีหรือไม่ ค่าสีของไส้กรอกสูตรเติมและไม่เติมผงกระดุกถูกแสดงในตาราง 13

ตารางที่ 13 ค่าสีของไส้กรอกปลาสูตรเสริมและไม่เสริมผงกระดุกปลาเกล็ดเงิน

ค่าสี	สูตรไส้กรอก	
	ควบคุม	เสริมผงกระดุกปลา
Hunter L^*	66.38 ± 0.26^{ns}	67.24 ± 0.29^{ns}
Hunter a^*	3.94 ± 0.18^b	4.65 ± 0.09^a
Hunter b^*	11.49 ± 0.08^b	13.33 ± 0.08^a

*a-b ที่เป็นตัวยกกำลังแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเติมผงกระดุกลงไปไส้กรอกปลาทำให้ค่าสีทำให้ค่าความสว่างมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่การเพิ่มขึ้นดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่รายงานที่ผ่านมาพบว่าการเติมผงกระดุกในซูริมีเจลจะทำให้ค่าความสว่างของเจลลดลงทั้งนี้เพราะอนุภาคของผงกระดุกปลาจะไปขัดขวางการส่องผ่านของแสงทำให้ค่าความสว่างลดลง (Tao and Park, 2014) แต่ในระบบของไส้กรอกอิมัลชันซึ่งประกอบไปด้วยองค์ประกอบของเครื่องเทศและส่วนผสมอื่นๆมากกว่าระบบเจลผลที่ได้อาจมีความแตกต่างจากที่เคยพบในระบบเจล นอกจากนั้นความเป็นสีแดงและสีเหลืองของตัวอย่างก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน มีรายงานว่า การเติมผงกระดุกลงในโปรตีนเจลที่ผลิตจากซูริมีส่งผลให้ค่าความเป็นสีแดงและค่าความเป็นสีเหลืองมีค่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าถึงแม้ว่าสีของไส้กรอกจะเปลี่ยนแปลงไปแต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นไปในเชิงบวกเนื่องจากความเป็นสีแดงของตัวอย่างเพิ่มขึ้นพร้อมกับความเป็นสีเหลือง การที่สีแดงและสีเหลืองของตัวอย่างที่มีผงกระดุกเพิ่มขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากการออกซิเดชันของโปรตีนและไขมันที่อยู่ในผงกระดุกเกิดเป็นรงควัตถุที่มีโทนสีเป็นสีน้ำตาล (Browning pigments) โดยรงควัตถุเหล่านั้นน่าจะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้สีของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป ทั้งนี้ไส้กรอกอิมัลชันที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดมักจะมีลักษณะปรากฏเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลดังนั้นการที่สีเหลืองของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นก็น่าจะเป็นการส่งเสริมคุณลักษณะอันพึงประสงค์สำหรับผู้บริโภค

4.2.4.3 เนื้อสัมผัส

ถึงแม้ว่าไส้กรอกปลาสูตรเสริมผงกระดุกจะได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความเหมาะสมสูงเหมาะกับการเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ แต่คุณภาพด้านอื่นๆของไส้กรอกก็ต้องได้รับการวิเคราะห์และประเมินเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส ดังนั้นแบบแผนของเนื้อสัมผัสจึงได้รับการวิเคราะห์ด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์ที่พยายามอธิบายคุณลักษณะต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการเคี้ยวให้อยู่ในรูปตัวเลข แบบแผนเหล่านั้นได้แก่ค่าความแข็งของตัวอย่าง (Hardness) หมายถึงค่าแรงที่ทำให้ตัวอย่างแตก ค่าความเป็นสปริง (Springiness) คือความสามารถในการคืนรูปของตัวอย่างเมื่อได้รับแรงกด ค่านี้จะบ่งบอกความยืดหยุ่นได้ด้วย ค่าความเป็นกัม (Gumminess) หมายถึงความสามารถในการถูกกัดซ้ำๆ ได้หลายครั้งโดยตัวอย่างมีการ

เปลี่ยนแปลงไปไม่มาก ค่าแรงยึดเกาะกันของโมเลกุลภายในตัวอย่าง (Cohesiveness) และค่าแรงยึดเกาะกันกับพื้นผิวอื่นของตัวอย่าง ผลจากการศึกษาได้ถูกสรุปไว้ใน ตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แบบแผนเนื้อสัมผัสของไส้กรอกอิมัลชันเสริมและไม่เสริมผงกระดุกปลา

สมบัติด้านเนื้อสัมผัส (Textural properties)	สูตรไส้กรอก	
	ควบคุม	เสริมผงกระดุก
ความแข็ง (Hardness, kg)	0.425 ± 0.115 ^b	0.655 ± 0.083 ^a
ความสามารถในการเกาะวัสดุอื่น (Adhesiveness, kg.s)	0.004 ± 0.003 ^{ns}	0.005 ± 0.003 ^{ns}
ความเป็นสปริง (Springiness, s)	0.348 ± 0.132 ^{ns}	0.341 ± 0.095 ^{ns}
ความสามารถในการเกาะกัน (Cohesiveness,)	0.297 ± 0.074 ^{ns}	0.303 ± 0.083 ^{ns}
ความเป็นกัม (Gumminess, kg)	0.129 ± 0.057 ^b	0.201 ± 0.089 ^a

*a-b ที่เป็นตัวเลขยกกำลังแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลจากการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของไส้กรอกแสดงให้เห็นว่าเนื้อสัมผัสของไส้กรอกสูตรเสริมและไม่เสริมผงกระดุกปลามีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะค่าความแข็งและความเป็นกัมของตัวอย่าง ในขณะที่ค่าแรงยึดเกาะในโมเลกุลของตัวอย่าง ความสามารถในการเกาะกับวัสดุอื่น และความเป็นสปริงมีค่าไม่แตกต่างกัน การเพิ่มขึ้นของความแข็งในสภาวะที่มีผงกระดุกปลาแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมที่อยู่ในผงกระดุกปลาได้ถูกปลดปล่อยออกมาในระบบก่อให้เกิดการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของไส้กรอก การปรับปรุงเนื้อสัมผัสของไส้กรอกด้วยแคลเซียมในกระดุกปลาน่าจะเกิดขึ้นได้ด้วยกลไกหลายอย่าง

อย่างแรกแคลเซียมที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีน (Protein conformation) โดยทำให้โปรตีนเปิดตัวออกมากขึ้นระหว่างการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งพฤติกรรมดังกล่าวในโปรตีนกลามเนื่องจากปลานิลได้รับการพิสูจน์มาแล้ว (Yongsawatdigul and Sinsuwan, 2007) นอกจากนั้นการมีแคลเซียมไอออนยังทำให้มีไฮโดรเจนและแอสคินจากกลามเนื้อปลาทรายแดงเปิดตัวออกนำมาซึ่งการเพิ่มขึ้นของพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำ (Surface hydrophobicity) อันเกิดจากการเปิดตัวของโครงสร้างโปรตีน การเปิดตัวดังกล่าวยังทำให้หมู่ซัลไฟไฮดริลมีความไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ได้อีกด้วย (Hemung and Yongsawatdigul, 2005) ปรากฏการณ์ดังกล่าวทำให้มีไฮโดรเจนเกิดการเกาะตัวรวมกันด้วยพันธะต่างๆ เช่น อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก พันธะไฮโดรเจน และพันธะไดซัลไฟด์ เป็นต้น ดังนั้นการมีแคลเซียมในอิมัลชันของโปรตีนปลาจึงเป็นเหมือนตัวเร่งให้โปรตีนเกิดการเกาะตัวกันของโปรตีนระหว่างการให้ความร้อนเกิดเป็นโครงร่างสามมิติที่มีความสามารถในการกักเก็บน้ำและเมื่อน้ำมันได้ดีขึ้นเมื่ออิมัลชันผ่านการให้ความร้อนจนเกิดการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์แบบก็จะทำให้ได้อิมัลชันเจลที่แข็งแรงกว่าการไม่เติมแคลเซียมเลย

อย่างที่สองอาจอธิบายได้จากการที่แคลเซียมไปกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูตามิเนสในกล้ามเนื้อปลาเกล็ดเงิน (ได้รับการพิสูจน์ว่ามีจริงจากผลการทดลองในรูปที่ 8) ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้ามของสายโปรตีนในตัวอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีโอซินเส้นหนักซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่าถูกเชื่อมข้ามด้วยเอนไซม์ดังกล่าวในสถานะที่มีแคลเซียมละลายได้จากกระดูกปลาเกล็ดเงิน พันธะที่เกิดขึ้นดังกล่าวเป็นพันธะที่แข็งแรงเนื่องจากเป็นพันธะโควาเลนต์และเป็นพันธะโควาเลนต์ที่ไม่สามารถถูกทำลายได้ด้วยสารรีดิวซ์ พันธะโควาเลนต์ที่ไม่ได้ถูกทำลายด้วยสารรีดิวซ์ก็ได้ถูกพบระหว่างการผลิตเจลจากซูริมิในสถานะที่มีการเติมสารประกอบแคลเซียมในรูปแบบต่างๆ (Lee and Park, 1998) พันธะดังกล่าวเรียกว่าพันธะไอโซเปปไทด์ (Isopeptide) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่เกิดจากการสร้างพันธะของหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนกลูตามีนและไลซีนที่ต่างก็ยึดเกาะกันอยู่บนสายโปรตีน การมีพันธะดังกล่าวในเจลของซูริมิซึ่งเชื่อว่าเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสได้รับการพิสูจน์โดยพบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวจะหายไปเมื่อมีการเติมสารยับยั้งทรานสกลูตามิเนส (Transglutaminase inhibitor) (Kumazawa et al., 1995) การเกิดพันธะดังกล่าวจึงทำให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการเชื่อมข้ามกันการเชื่อมข้ามดังกล่าวทำให้โครงสร้างของเจลมีความแข็งแรงมากยิ่งขึ้นจึงสะท้อนออกมาที่ค่าความแข็งของเจลที่เพิ่มขึ้น การเติมผงกระดูกปลา Pacific whiting ในเจลจากซูริมิจากปลา Alaska Pollock ก็ก่อให้เกิดความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้นเช่นเดียว (Tao and Park, 2014) นอกจากนั้นประสิทธิภาพของการเพิ่มความแข็งแรงของเจลก็ขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคของผงกระดูกด้วย โดยพบว่าอนุภาคที่มีขนาดระดับไมโครเมตร (nano scale) จะมีประสิทธิภาพในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเจลได้มากกว่าผงกระดูกขนาดไมโครเมตร (150 ไมโครเมตร) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้กลับพบว่าการเติมผงกระดูกปลาเกล็ดเงินที่มีขนาด 38 ไมโครเมตร ซึ่งจัดเป็นอนุภาคระดับไมโครเมตรกลับมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสและส่งผลให้เกิดการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของไส้กรอกปลาได้ซึ่งขัดแย้งกับรายงานที่กล่าวมาแล้ว ข้อขัดแย้งดังกล่าวอาจเกิดเนื่องมาจากตัวอย่างผงกระดูกที่เตรียมได้จากปลาคนละชนิด นอกจากนั้นกรรมวิธีในการเตรียมก็แตกต่างกันโดยการศึกษาครั้งนี้ได้นำกระดูกที่ผ่านการต้มด้วยสารละลายต่างไปให้ความร้อนภายใต้ความดันสูงก่อนนำมาอบและบดเป็นผงในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้นี้ไม่มีขั้นตอนนี้ การให้ความร้อนภายใต้ความดันอาจทำให้โครงสร้างของผงกระดูกถูกทำลายและทำให้ปริมาณแคลเซียมสามารถหลุดออกมาได้มากกว่าก็เป็นได้ ทั้งนี้ปริมาณแคลเซียมละลายได้ของการศึกษาครั้งที่แล้วก็ไม่ได้รับการรายงาน

การเติมผงกระดูกในไส้กรอกจะทำให้เกิดการละลายออกมาของแคลเซียมแล้วแคลเซียมละลายได้นี้ก็จะไปกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูตามิเนสและก่อให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนทำให้ส่งเสริมการเกิดเจลของอิมัลชันเกิดเป็นโครงร่างสามมิติของเจลที่ได้มีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น การเติมผงกระดูกปลาในซูริมิส่งเสริมการเกิดเจลซึ่งตรวจวัดด้วยหลักวิทยากระแส (Rheology) ก็ได้รับการรายงานเช่นกัน (Tao et al., 2014) การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของซูริมิเจลโดยการเติมกระดูกปลาก็ได้รับการยืนยันเช่นกัน (Kim et al., 1998) เมื่อโครงสร้างของเจลได้รับการปรับปรุงให้มีความแข็งแรงและมีเสถียรภาพมากขึ้นจึงทำให้สามารถกักเก็บน้ำและไขมันไว้ในโพลได้เป็นอย่างดีส่งผลให้เกิดการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการเติมเสริมผงกระดูกในไส้กรอกปลานอกจากจะเป็นการเพิ่มแคลเซียมในผลิตภัณฑ์แล้วยังก่อให้เกิดการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์โดยการกระตุ้นศักยภาพของเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อปลาให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.2.4.4 การประเมินทางประสาทสัมผัส

ไส้กรอกปลาที่ผลิตได้ถึงแม้จะผ่านการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสและพบว่าเนื้อสัมผัสได้รับการปรับปรุงเมื่อมีการเติมผงกระดูกปลา แต่การเพิ่มขึ้นของเนื้อสัมผัสดังกล่าวสามารถรับรู้ได้ด้วยผู้บริโภคหรือไม่เป็นสิ่งที่จำเป็นต้องได้รับการประเมินเช่นเดียวกันเนื่องจากหากการเพิ่มขึ้นดังกล่าวผู้บริโภคไม่สามารถแยกแยะออกได้ก็เหมือนกับเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไม่ได้รับการปรับปรุง เพราะการปรับปรุงเนื้อสัมผัสมีขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ดังนั้นการประเมินความชอบต่อผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นจึงได้รับการประเมินโดยใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกอบรม ข้อมูลที่ได้จะสะท้อนถึงความพึงพอใจของผู้บริโภคได้มากกว่าการใช้ผู้บริโภคที่ผ่านการอบรม ผลจากการศึกษาแสดงได้ดังตารางที่ 15

ผลจากการประเมินคุณภาพด้วยผู้ทดสอบที่เป็นผู้บริโภคแสดงให้เห็นว่าไส้กรอกที่ถูกผลิตขึ้นได้รับการยอมรับมากกว่าร้อยละ 50 ดังจะเห็นได้จากคะแนนเฉลี่ยของความชอบต่อคุณลักษณะด้านต่างๆมีค่าประมาณ 5 จากระดับคะแนนทั้งหมด 9 นอกจากนั้นคะแนนความชอบโดยรวมก็พบว่ามีค่าสูงที่ระดับประมาณ 6 ไม่ว่าไส้กรอกนั้นจะมีการเติมหรือไม่เติมแคลเซียม แต่เมื่อพิจารณาแต่ละคุณลักษณะคุณภาพจะพบว่าการเติมผงกระดูกในสูตรไส้กรอกทำให้คะแนนความชอบต่อลักษณะปรากฏ สี กลิ่นรสมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยส่งผลให้คะแนนชอบโดยรวมมีค่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามรสชาติของไส้กรอกไม่มีความเปลี่ยนแปลงเพราะค่าความชอบต่อคุณลักษณะด้านนี้มีค่าไม่แตกต่างกันไม่จะมีการเติมหรือไม่เติมผงกระดูกปลาก็ตาม ผลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าการเติมกระดูกช่วยเพิ่มเนื้อสัมผัสและทำให้ผลิตภัณฑ์ได้รับการยอมรับมากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นสีสนของผลิตภัณฑ์ที่พลอยได้รับการปรับปรุงจากการเติมผงกระดูกด้วยดังจะเห็นว่าความเป็นสีเหลืองและสีแดงมีค่าเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ได้รับการยอมรับด้านสีมากขึ้น

ดังนั้นการผลิตไส้กรอกปลาสูตรเสริมผงกระดูกปลาจึงมีความเป็นไปได้สำหรับการผลิตเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตามหากสามารถทำการประเมินการยอมรับของผลิตภัณฑ์โดยใช้ผู้ทดสอบในวงกว้างกว่านี้ก็จะได้ข้อมูลที่สะท้อนถึงศักยภาพด้านการตลาดมากยิ่งขึ้น

ตารางที่ 15 คุณลักษณะด้านการยอมรับของไส้กรอกเสริมและไม่เสริมผงกระดูกปลา

คุณลักษณะด้านการยอมรับ (Preferential attributes)	สูตรไส้กรอก	
	ควบคุม	เสริมผงกระดูก
ลักษณะปรากฏ	5.73 ± 1.43^{ns}	5.97 ± 1.46^{ns}
สี	5.68 ± 1.65^b	6.06 ± 1.66^a
เนื้อสัมผัส	5.74 ± 1.57^b	6.06 ± 1.61^a
รสชาติ	5.59 ± 1.65^{ns}	5.60 ± 2.09^{ns}
การยอมรับโดยรวม	6.02 ± 1.67^b	6.21 ± 1.85^a

*a-b ที่เป็นตัวเลขยกกำลังแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3 สรุป

ผงกระดูกจากปลาเกล็ดเงินได้ผ่านการกำจัดเนื้อติดก้างด้วยการบำบัดด้วยสารละลายต่าง ทำให้นุ่มด้วยการให้ความร้อนสูงภายใต้ความดันก่อนทำแห้งและบดเป็นผง เมื่อละลายผงกระดูกที่ได้กับน้ำพบว่ามีความเคลือบละลายได้หลุดออกมาและสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสรวมทั้งเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้ามโปรตีนได้ ผงกระดูกดังกล่าวได้ถูกเติมลงในไส้กรอกปลาร้อยละ 1 ส่งผลให้ตัวอย่างไส้กรอกที่มีแคลเซียมทั้งหมด 178 มิลลิกรัมต่อหน่วยบริโภค จึงถูกจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีแคลเซียมสูงเพราะมีค่าสูงกว่าร้อยละ 20 ของปริมาณที่แนะนำให้คนไทยบริโภคต่อวัน นอกจากนั้นองค์ประกอบด้านอื่นๆไม่ได้รับผลกระทบ สีของไส้กรอกมีความเป็นสีเหลืองและแดงเพิ่มมากขึ้นซึ่งน่าจะส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค เนื้อสัมผัสของไส้กรอกได้รับการปรับปรุงโดยเฉพาะค่าความเป็นแข็งและความเป็นกัม ผลดังกล่าวเกิดจากการที่แคลเซียมในผงกระดูกละลายออกมาและไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในกล้ามเนื้อปลาเกิดการเชื่อมข้ามของกล้ามเนื้อปลา การเพิ่มขึ้นของค่าทางด้านเนื้อสัมผัสส่งผลให้ผู้บริโภคยอมรับในผลิตภัณฑ์ด้านสีและเนื้อสัมผัสเพิ่มขึ้นและค่าการยอมรับโดยรวมก็สูงตามไปด้วย ดังนั้นการเติมผงกระดูกในไส้กรอกปลาจึงเป็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณแคลเซียมในผลิตภัณฑ์และปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ในเวลาเดียวกัน

บทที่ 5

บทสรุป

กระดุกปลาที่เหลือจากการแปรรูปสามารถนำมาผลิตเป็นผงกระดุกเพื่อเป็นแหล่งของแคลเซียมธรรมชาติได้ โดยการกำจัดอินทรีย์สารจำพวกโปรตีนและไขมันออกจะทำให้กระดุกมีปริมาณแร่ธาตุสูงขึ้น ดังนั้นการกำจัดเนื้อติดกระดุกปลาด้วยน้ำและสารละลายต่างจึงได้รับการศึกษา โดยกระดุกที่ได้จะถูกทำให้นุ่มขึ้นโดยการให้ความร้อนสูงภายใต้ความดันก่อนนำไปอบแห้งและบดเป็นผงที่มีขนาดเล็กกว่า 38 ไมโครเมตร ผลจากการศึกษาพบว่าการใช้สารละลายต่างร้อนบำบัดกระดุกทำให้สามารถกำจัดโปรตีนและไขมันออกจากโครงสร้างได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้น้ำเพียงอย่างเดียว โดยที่โครงสร้างทางเคมีของกระดุกไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้พื้นผิวของผงกระดุกก็เกิดการกัดกร่อนที่มากกว่านำมาซึ่งรูพรุนและพื้นที่ผิวมากขึ้น ทำให้สันนิษฐานได้ว่าแคลเซียมไอออนอาจถูกชะออกมาได้มากกว่าตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว ลักษณะทางกายภาพของกระดุกที่เคี้ยวพบว่า การบำบัดด้วยต่างทำให้สีของผงกระดุกมีค่าความเป็นสีแดงและสีเหลืองเพิ่มขึ้น

ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในผงกระดุกปลาเกล็ดเงินและปลานิลพบว่ามีร้อยละ 32 แต่ปริมาณแคลเซียมที่ละลายได้กลับพบว่ามีค่าน้อยมากโดยคิดเป็นร้อยละ 0.5-0.6 ทั้งนี้กระดุกปลาเกล็ดเงินมีค่าแคลเซียมละลายได้มากกว่าปลานิลทำให้มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง ในขณะที่ผงกระดุกจากปลานิลต้องผ่านการสกัดด้วยกรดก่อนจึงจะทำให้มีปริมาณแคลเซียมละลายได้เพิ่มมากขึ้น การใช้กรดอะซิติกเป็นสารสกัดในเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมทำให้ได้ปริมาณแคลเซียมละลายได้ออกมามากขึ้นประมาณ 13 เท่า

เมื่อนำผงกระดุกปลาเกล็ดเงินที่ผ่านการบำบัดด้วยสารละลายต่างไปใช้ประโยชน์เพื่อส่งเสริมสมบัติเชิงหน้าที่ผ่านการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลา ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวในสภาวะที่มีและไม่มีแคลเซียมจึงได้รับการศึกษาและพบว่าแคลเซียมละลายได้สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลาเกล็ดเงินได้ โดยมีกิจกรรมใกล้เคียงกันกับการกระตุ้นด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน นอกจากนี้แคลเซียมละลายได้ในการทดลองนี้ก็สามารถเร่งการเชื่อมข้ามของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาเกล็ดเงินซึ่งแสดงได้จากแบบแผนของโปรตีน ผงกระดุกปลาเกล็ดเงินมีศักยภาพเป็นแหล่งของแคลเซียมและปริมาณแคลเซียมที่ละลายออกมาก็มีปริมาณเพียงพอที่จะกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูตามิเนสในกล้ามเนื้อปลาเพื่อเร่งการเชื่อมข้ามกล้ามเนื้อปลา ดังนั้นการเพิ่มแคลเซียมและพัฒนาเนื้อสัมผัสด้วยผงกระดุกปลาที่ผลิตได้จึงควรได้รับการศึกษาโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อิมัลชันเจลจากโปรตีนปลาอย่างเช่นไส้กรอกปลา

การศึกษาผลของผงกระดุกปลาต่อคุณภาพของไส้กรอกปลาได้รับการศึกษาที่ปริมาณกระดุกร้อยละ 1 (โดยน้ำหนัก) และผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า การเติมผงกระดุกทำให้ได้ไส้กรอกที่มีแคลเซียมเพิ่มมากขึ้น 15 เท่า จนทำให้จัดได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์แคลเซียมสูง การเติมผงกระดุกไม่ทำให้โครงสร้างของอิมัลชันเจลเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้คุณภาพด้านลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสของไส้กรอกที่ได้ก็ได้รับการพัฒนาขึ้นไม่ว่าจะประเมินด้วยหลักการวิเคราะห์สีและเนื้อสัมผัส การยอมรับของผู้บริโภคก็เป็นไปในทิศทางเดียวกันกล่าวคือไส้กรอกสูตรเสริมผงกระดุกได้รับการยอมรับเพิ่มขึ้นเมื่อพิจารณาตามลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รส และความชอบโดยรวม ดังนั้นการใช้ผงกระดุกมาผลิตเป็นสารเติมแต่งอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารและพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เชิงการค้าจึงมีความเป็นไปได้

ข้อเสนอแนะ

1. การเพิ่มความสามารถในการละลายของแคลเซียมที่อยู่ในผงกระดูกให้ได้มากขึ้นจะทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากแคลเซียมในกระดูกได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ
2. ความสามารถในการถูกย่อยของผงกระดูกปลาที่เติมลงในไส้กรอกควรได้รับการศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลบ่งบอกว่าการบริโภคไส้กรอกเสริมผงกระดูกปลาจะทำให้ผู้บริโภคได้รับแคลเซียมมากน้อยเพียงใด
3. การศึกษาความสามารถในการถูกย่อยของผลิตภัณฑ์เสริมกระดูกปลาเกล็ดเงินในหลอดทดลอง (*In vitro*) ควรได้รับการศึกษาเพื่อประเมินว่าผงกระดูกที่เติมลงไปมีศักยภาพในการถูกนำไปใช้ประโยชน์ต่อร่างกายมากน้อยเพียงใด
4. การดูดซึมและนำแคลเซียมจากผงกระดูกปลาไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อกระบวนการพัฒนาของกระดูกหรือการซ่อมแซมโรคอันเกิดจากการเสื่อมของกระดูกควรได้รับการศึกษาในระบบสิ่งมีชีวิต (*In vivo*) เพื่อเป็นข้อมูลที่เข้มแข็งในการยืนยันคุณประโยชน์ของการนำแคลเซียมจากผงกระดูกปลาที่มีต่อสุขภาพ

เอกสารอ้างอิง

- Association of Official Analytical Chemists. (2000). Official Methods of Analysis, 17th ed. AOAC. Maryland, USA.
- Binsi, P. K. and Shamasundar, B. A. (2012). Purification and characterization of transglutaminase from four fish species: Effect of added transglutaminase on the viscoelastic behaviour of fish mince. *Food Chemistry*, 132, 1922-1929.
- Barakat, N. A. M., Khil, M. S., Omran, A. M., Sheikh, F. A., and Kim, H. Y. (2009). Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *Journal of Material Processing Technology*, 209, 3408-3415.
- Boutinguiza, M., Pou, J. Comesana, R., Lusquinos, F., de Carlos, A., and Leon, B. (2012). Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering C*. 32, 478-486.
- Martinez-Valverde, I., Periago, M. J., Santaella, M., and Ros, G. (2000). The content and nutritional significance of minerals on fish flesh in the presence and absence of bone. *Food Chemistry*, 71, 503-509.
- Chin, K. B. Keeton, J. T., Longnecker, M. T., and Lamkey, J. W. (1999). Utilization of soy protein isolate and konjac blends in a low-fat bologna (Model system). *Meat Science*, 53, 45-57.
- Coman, V., Grecu, R., Baciut, M., Baciut, G., Prodan, P., and Simon, V. (2007). Investigation of different bone matrices by vibrational spectroscopy. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 9(11), 3372-3375.
- Fan, L., Chen, J. P., Xiong, S. B., and Yang, W. H. (2008). Effect of ball-milling treatment on physico-chemical properties of Silver carp bone powder. *Chinese Journal of Food Science*, 29(9), 70-73.
- 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*, 61, (3), 517-520.
- Hellmich, C., Ulm, F. J. (2002) Are mineralized tissues open crystal foams reinforced by cross-linked collagen?- Some energy arguments. *Journal of Biomechanics*, 35, 1199-1212.
- Hemung, B. (2013). Properties of tilapia bone powder and its calcium bioavailability based on transglutaminase assay. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4), 306-309.
- Hemung, B. and Yongsawatdigul, J. (2005). Ca^{2+} affects physicochemical and conformational changes of threadfin bream myosin and actin in a setting model. *Journal of Food Science*, 70(8)455-460.
- Ishikawa, M., Mori, S., Watanabe, H., and Sakai, Y. (1988). Softening of fish bone: Effect of acetic acid on softening rate and solubilization rate of organic matter from fish bone. *Journal of Food Processing and Preservation*. 13(2), 123-132.

- Jager, I., Fratzl, P. (2000). Mineralized collagen fibrils: A mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophysical Journal*, 79, 1737-1746.
- Jin, Q. H. and Li, G. L. (1998). Research on nutrition of Chinese silver carp. *Food Science*, 19(8), 41-43.
- Kim, S. K., Park, P. J., Byun, H. G., Je, J. Y., and Moon, S. H. (2003). Recovery of fish bone from hoki (*Johnius belengeri*) frame using a proteolytic enzyme isolated from mackerel intestine. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 255-266.
- Kettawan, A., Sungpuag, P., Sirichakwal, P. P., and Chavasit, V. (2002). Chicken bone calcium extraction and its application as a food fortificant. *Journal of National Research Council Thailand*, 34, 163-180.
- Kim, J. S., Yeum, D. M., and Joo, D. S. (1998). Improvement of the functional properties of surimi gel using fish bone. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 41(2), 175-180.
- Kizilkaya, B., Tekinay, A. A., and Dilgin, Y. (2010). Adsorption and removal of Cu (II) ions from aqueous solution using pretreated fish bones. *Desalination*, 264, 37-47.
- Kongsri, S., Janpradit, K., Buapa, K., Techawongstien, S., Chanthai, S. (2013). Nanocrystalline hydroxyapatite from fish scale waste: Preparation, characterization and application for selenium adsorption in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 215-216, 522-532.
- Kumazawa, Y., Numazawa, T., Seguro, K., and Motoki, M. (1995). Suppression of surimi gel setting by transglutaminase inhibitors. *Journal of Food Science*, 60(4), 715-717.
- Larsen, T., Thilsted, S. H., Konsbak, K., and Hansen, M. (2000). Whole small fish as a rich calcium source. *British Journal of Nutrition*, 83, 191-196.
- Lim, H. K., Teng, T. T., Ibrahim, M. H., Ahmad, A., and Chee, H. T. (2012). *APCBEE Procedia*, 1, 96-102.
- Lee, N. and Park, J. W. (1998). Calcium compounds to improve gel functionality of Pacific whiting and Alaska Pollock surimi. *Journal of Food Science*, 63(6), 969-974.
- Malde, M., Bugel, S., Kristensen, M., Malde, K., Graff, I., and Pedersen, J. (2010). Calcium from salmon and cod bone is well absorbed in young healthy men: a double-blinded randomized crossover design. *Nutrition and Metabolism*, 7(1), 61-69.
- Malde, M. K., Graff, I. E., Siljander-Rasi, H., Venalainen, E., Julshamn, K., Pedersen, J. I., and Valaja, J. (2010). Fish bone-a highly available calcium source for growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94, 66-76.
- Miura, T. and Nakano, M. (1998). Calcium bioavailability of total bone extract (TBE) and its effects on bone metabolism in rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, 1307-1321.
- Nozawa, H., Cho, S., and Seki, N. (2001). Purification and characterization of transglutaminase from squid gill. *Fisheries Science*, 67(5), 912-919.

- Ozawa, M. and Suzuki, S. (2002). Microstructure development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment. *Journal of American ceramists Society*, 85, 1315-1317.
- Phiraphinyo, P., Taepakpurenat, S., Lakkanatinaporn, P., Sunthornsuk, W., and Suntornsuk, L. (2005). Physical and chemical properties of fish and chicken bones as calcium source for mineral supplements. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 28(2)327-335.
- Piccirillo, C., Silva, M. F., Pullar, R. C., Braga da Cruz, I., Jorge, R., Pintado, M.M.E., and Castro, P. M. L. (2013). Extraction and characterisation of apatite-and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. *Materials Science and Engineering C*, 33, 103-110.
- Prabakaran, K., and Sajeswari, S. (2006). Development of hydroxyapatite from natural fish bone through heat treatment. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 20(1), 20-23.
- Roig, M. J., Alegria, A., Barbera, R., Farre, R., and Lagarda, M. J. (1999). Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas. *Food Chemistry*, 64, 403-409.
- Shanil, Juma, M. S., Sugenia Sohn, M. S., and Bahram, H. A. (1999). Calcium-enriched bread support skeletal growth of young rats. *Nutrition Research*, 19, 389-399.
- Shimosaka, C. (2002). Relationship between the chemical composition and crystalline structure of fish bone cured in an acetic acid solution. *Journal of Clinical Biochemistry and Clinical Nutrition*. 31, 9-17.
- Shimosaka, C. (1998). Changes in chemical composition and crystalline structure in fish bone during cooking. *Journal of Clinical Biochemistry and Clinical Nutrition*. 26, 173-182.
- Sittikulwitit, S., Sirichakwal, P. P., Puwastien, P., Chawasit, V., and Sungpuag, P. (2004). In vitro bioavailability of calcium from chicken bone extract powder and its fortified products. *Journal of Food composition and Analysis*, 17, 321-329.
- Szpak, P. (2011). Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *Journal of Archaeological Science*, 38, 3358-3372.
- Suloma, a., Mabroke, R. S., El-Haroun, E. R. (2012). Meat and bone meal as a potential source of phosphorous in plant-protein-based diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacultural Interantional*, DOI 10.1007/s10499-012-9559-8.
- Takagi, J., Saito, YI, Kikuchi, T., and Inada, Y. (1986). Modification of transglutaminase assay: use of ammonium sulfate to stop reaction. *Analytical Biochemistry*, 153(2), 295-298.
- Tont, S. A., Percy, W. G., and Arnold, J. S. (1977). Bone structure of some marine vertebrates. *Marine biology*, 39, 191-196.
- 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*, B., 146, 395-401.

- Wei, Z., Kangsen, M., Baigang, Z., Fuzhen, W., and Yu, Y. (2004). A study on the meat and bone meal and poultry by-product meal as protein substitutes of fish meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei* Juveniles. *Journal of Ocean University of China* (Oceanic and Coastal Sea Research), 3(2), 157-160.
- Weiner, S., Traub, W. (1995). Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Letters*, 206, 262-266.
- Worratao, A. and Yongsawatdigul, J. (2005). Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*, 93, 651-658.
- Wu, g., Zhang, M., Wanga, Y., Mothibe, K., and Chen, W. (2012). Production of silver carp bone powder using superfine grinding technology: suitable production parameters and its properties. *Journal of Food Engineering*, 109(4), 730-735.
- Yin, T. and Park, J. W. (2014). Effects of nano-scaled fish bone on the gelation properties of Alaska Pollock surimi. *Food Chemistry*, 150, 463-468.
- Yin, T. Reed, Z. H. and Park, J. W. (2014). Gelling properties of surimi as affected by the particle size of fish bone. *LWT-Food Science and Technology*, 58, 412-416.
- Yongsawatdigul, J., and Sinsuwan, S. (2007). Aggregation and conformational changes of tilapia actomyosin as affected by calcium ion during setting. *Food Hydrocolloids*, 21(3)359-367.
- Yongsawatdiul, J. worratao, A. and Park, J. W. (2002). Effect of endogenous transglutaminase on threadfin bream surimi gelation. *Journal of Food Science*, 67(9), 3258-3263.
- Xu, S. (1996). Calcium powder of freshwater fish bone. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 5(4), 246-251.

ภาคผนวก

1. รายงานผลงานที่เกิดจากการได้รับทุนของ สกว.
2. นิพนธ์ต้นฉบับของผลงานที่ส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ผลผลิตจากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. นิพนธ์ต้นฉบับของงานวิจัยที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 - Sriuttha, M., Chantarangsi, M., and Hemung, B. (2015). Characteristics of tilapia bone powder and calcium extraction by acid solution. Asian Journal of Chemistry. **Submitted.**
 - Hemung, B., Yongsawatdigul, J., and Chin, C. B. (2015). Effect of silver carp bone powder as transglutaminase activator improving fish sausage qualities. Journal of Food Science. **Submitted.**
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงสาธารณะ มีการต่อยอดงานวิจัยเพื่อถ่ายทอดสู่ชุมชนผ่านโครงการบริการวิชาการของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้หลักสูตรฝึกอบรมการผลิตหมูยอแคลเซียมสูง ซึ่งมีกำหนดการดำเนินการภายในปีการศึกษา 2557
3. การนำเสนอผลงานต่อที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
 - Bung-Orn Hemung, Koo Bok Chin, and Jirawat Yongsawatdigul. (2011). Conformational changes and gelling properties of fish myofibrillar proteins as affected by acid/alkaline treatments and microbial transglutaminase. Poster presentation in “The 2011 International Conference on Food Factors (IcoFF2011)”. Taipei, Taiwan, November 20th-23rd.
 - Bung-Orn Hemung, Koo Bok Chin, and Jirawat Yongsawatdigul. (2012). Conformational changes and gelling properties of fish myofibrillar proteins as affected by acid/alkaline treatments and transglutaminases. Poster presentation in “The 2012 Annual meeting of RGJ congress”. Jomtein Palm Beach Resort and Hotel. Cha-am, Pethburi, October 10-12th.
 - Bung-Orn Hemung, Koo Bok Chin, and Jirawat Yongsawatdigul. (2015). Effect of silver bone powder on the quality of fish emulsion sausage. Poster presentation in “The Internation Journal of Food Science and Technology 50th Cerebration Conference: The future of food innovation, nutrition and technology” Lincoln University, New Zealand, Feburay 17-19th.

To be submitted to
Asian Journal of Chemistry

“Characteristics of Tilapia Bone Powder and Its Calcium Extraction by Acid Solutions”

¹Manop Sriuttha, ¹Mallika Chantarangsri and ^{1,2}Bung-Orn Hemung*

¹*Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Nong Khai Campus,
Nong Khai 43000, Thailand*

²*The Indo-China Country Trade and Economic Research Sector, Khon Kaen University, Nong
Khai Campus, Nong Khai 43000 Thailand.*

*e-mail: bunhem@nkc.kku.ac.th, hemung3@gmail.com

ABSTRACT

Tilapia bone powder was prepared by water and alkaline treatments, autoclaved, dried, and ground to be powder. The results from the Fourier-transform infrared spectroscopy indicated that tilapia bone powders consisted of inorganic matter, especially hydroxyapatite. The proximate analysis revealed that organic compounds, protein and fat, were presented but they could be removed more effectively alkaline treatment than that of water. Microstructure showed the corrosive surface for sample treated with alkaline, while the compact surface was found in another one. Therefore, the alkaline-treated bone was selected for calcium extraction by different acids and the calcium content was estimated by the redox titration. Based on the extractability and feasibility in food application, an acetic acid was selected as the suitable acid. The suitable concentration and extraction time were further evaluated and the results turned to be at 0.25 M for 48 h. When, the tilapia bone powder was use to extract calcium at this condition, the exact content of calcium was 2,376 mg/L, as quantified exactly by the inductively couple plasma-optical emission spectroscopy. The obtained calcium solution could activate the activity of calcium-dependent enzyme, crude transglutaminase, suggesting the availability for biological reaction.

Key words: calcium; fish bone; transglutaminase, acid solutions

INTRODUCTION

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the fresh water fish species and it is produced commercially through an aquaculture around the world with the annual production equal to trout and salmon.¹ Tilapia is currently processed to be either food or non-food products such as a frozen fillet or leather.² Through those processes, tilapia frame must be removed and it is considered as waste or by-products accounting for up to 15 % of the fish weight. Fish bone ash is the major component in such waste and consists of 34-36 %.³ However, it is currently used to make fish bone meal for feeding although it is the good source for important mineral, especially calcium and phosphorous.⁴ The potential of fish bone as a source of mineral supplement was documented.⁵ In addition, a calcium capsule containing tilapia bone powder has been developed for being the calcium supplementary.² Generally, calcium in fish bone powder is mainly found in the hydroxyapatite form (HA), which is hardly solubilized.³ The bioavailability of the fish bone capsule might be limited. Thus, extraction of calcium from fish bone powder is necessary for fulfilling the nutritional implication.

Application of the pulsed-electric-field-assisted extraction was reported as an effective method to solubilize calcium from the bone.⁶ However, this technique has not yet been applied commercially. It seems like acid extraction is more feasible since it provides high extraction rate.⁷ However, extraction of calcium from fish bone has not been investigated, while that for pig bone and egg shell has been performed. Thus, extraction process of calcium from fish bone by acid solution should be optimized. This would lead to the strategy for calcium recovery from waste for being the mineral source. In addition, the bioavailability of soluble calcium should also be evaluated for gaining the health benefit. This value of calcium from fish bone has been performed in either *in vitro* or *in vivo* systems.⁸⁻⁹ However, the potential of soluble calcium as cofactor for enzyme is also represented the bioavailability as well. The activation ability of soluble calcium from fish bone to activate transglutaminase (TGase), calcium- dependent enzyme, was documented.¹ This breakthrough provided the simple method to evaluate the bioavailability of calcium extracted from fish bone.

Therefore, the objectives of this study were to characterize the tilapia bone powder. The extraction of calcium by acid solutions was optimized. Thereafter, the bioavailability of extracted calcium was evaluated based-on the TGase assay.

EXPERIMENTS

Tilapia bone preparation and characterization

Fish bone powder was prepared according to the method described previously with slight modification.¹ The main frame of tilapia was soaked in hot water and alkaline solution

(0.8 % NaOH, w/v) at a ratio of bone to solution of 1:2 (w/w) for 1 h. The bone samples were rinsed with distilled water, autoclaved at 121 °C (350 g.cm⁻²) for 1 h, and dried overnight in an oven at 105 °C. The dried samples were ground into powder and sieved through a 38 µm mesh and used as water-treated bone and alkaline-treated bone powders, respectively.

Chemical compositions were analyzed for moisture, crude protein, crude fat, and total ash contents by the standard method from American Official Analytical Chemists.¹⁰

The bone powder was mixed with KBr at the ratio of 1: 40 and pressed into discs before determining the vibrational spectra by the Fourier-transformed infrared (FT-IR) spectroscopy (Spectrum one 60045, Perkin Elmer, England). The spectra were recorded as the average from 32 scans in the wave number from 4000-450 cm⁻¹.

Microstructure was analyzed by the scanning electron microscopy (SEM) after gold coating at 5,000 magnification using S-3000N (Hitachi, Japan).

Optimization of calcium extraction

The extractability of calcium from tilapia bone powder (Alkaline-treated bone) was evaluated using sulfuric acid, hydrochloric acid, nitric acid, acetic acid, and citric acid at 0.25 M. The bone powder was mixed with each acid solution at the ratio of 1:20 (w/v) for 1 h. The calcium was extracted by shaking the mixture at room temperature at the speed of 200 rpm. The clear solution was filtered through filter paper (Whatman® No. 1) before precipitating into calcium oxalate. Then, the oxalate was solubilized by addition of sulfuric acid. Finally, the soluble calcium was quantified roughly by the redox titration as described previously.¹¹ The extractability was normalized and the highest value was considered as 100 %.

The bone powder was mixed with an acetic acid at different concentrations (0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50, and 1.00 M). Extraction process was fixed at the same shaking speed, same shaking time, and same ratio of powder : acetic acid at room temperature. Extractability was recorded after quantifying the calcium content in solution by redox titration and expressed as normalized data as described as above.

The bone powder was used to extract calcium by acetic acid at 0.25 M for different times (1, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 h) by fixing the extraction process as described above. Calcium content was also quantified by redox titration method before expressing the data and reported as normalized value as described previously.

Bioavailability of extracted calcium from tilapia bone

Tilapia bone powder (alkaline-treated bone) was used to extract calcium by an acetic acid (0.25 M) for 48 h at room temperature. The extracted solution was adjusted to pH 7.0.

The exact concentration was determined by the inductive couple plasma-optical emission spectroscopy (Optima 4300 DV; Perkin Elmer Instruments; Norwalk, CT, USA). The emission wavelength for calcium was recorded at 317.933 nm and the calcium content in the extract was reported to be 2,376 mg/L. This solution was used to activate the crude transglutaminase (TGase) from tilapia muscle to catalyze the incorporation of monodansyl cadaverine (MDC) into the dimethylated casein (DMC) as described for TGase activity determination.

The crude TGase was extracted from tilapia muscle by homogenizing the fish muscle (10 g) with 90 mL of an extraction buffer (10 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5). The homogenate was centrifuged at 10,000 × g for 30 min. The supernatant was filtered through the filter paper (Wattman® No. 1) and the filtrate was used as crude TGase.

The cocktail reaction for TGase activity contained DMC (2 mg/mL), Tris-Cl, pH 7.5 (70 mM), DMC (15 µM) and 100 µL of crude TGase. The reaction was incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was stopped by adding ammonium sulfate to the final concentration of 400 mM. The fluorescence intensity of reaction was monitored at excitation and emission wavelengths of 350 and 480 nm, respectively.

Statistical analysis

The data were analyzed using multiple comparison tests with one-way ANOVA (SPSS, 16.0). The difference was considered at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Chemical compositions

The chemical composition of bone powder was affected by the different methods for removing of the organic matters. Moisture content was still found in the bone powder although it is appeared as the dried powder. This suggested that water molecule could be re-absorbed water after drying process. Moisture content in tilapia bone treated with alkaline was higher than that treated with water (Table 1). Due to the similar preparation method, this value was comparable to that reported previously.¹ However, it was much lower than that reported for cod, saithe, blue whiting, salmon, trout, herring and mackerel because organic substances were removed by different methods from our study.¹² It can be seen that sample treated with alkaline solution showed higher moisture content than another sample. This suggested alkaline-treated powder adsorbed water to the greater extent than that of another one. Thus, the binding sites on bone particle for chemical reaction were more available when it is treated with alkaline.

Protein content in sample treated with alkaline was observed at the lower level when compared with another sample. It has been established that collagen was the major

protein found in bone matrix.¹³ This suggested that the alkaline treatment allow collagen to be eliminated to the greater extent than water. Softening of connective tissue from fish bone under alkaline condition has been reported.¹⁴ However, the collagen could not be removed completely as evidenced by presenting of protein in the sample. This might be because the collagen may be imbedded inside of the mineral crystal as model proposed previously.¹³ Application of alkaline also provided more benefit by getting rid of fat since a reduction of crude fat was observed (Table 1). This indicated that the organic matters could be removed more effectively by alkaline solution. Consequently, total ash content was increased and it is observed as the major component. Therefore, tilapia bone powder showed a potential to be the source of natural mineral, especially calcium.

FT-IR

The FT-IR spectra of fish bone powder showed the signal corresponding to the vibration of several functional groups, which are classified as either organic or inorganic matters (Fig. 1). The signal at wave number of 560 cm^{-1} was reported to be the vibration of an inorganic phosphate $[(\text{PO}_4)]^{2-}$.¹⁵ In addition, it was found in both bone powders. The O-H stretching was observed at wave number of $3,423\text{ cm}^{-1}$. This suggested that calcium in the bone is in the form of calcium hydroxyapatite. The apatite from cod and sner fish (*Thynnus thynnus*) has also been characterized.^{4, 16} The vibration of organic groups through the C-H stretching at $1,451$ and $1,419\text{ cm}^{-1}$ were generated from CH_3 and CH_2 , respectively. The signal for organic compounds was also observed at wave number of $2,923\text{ cm}^{-1}$. This is suggested that the organic compounds were presented in the sample, corresponding to the observation of fat and protein (Table 1). The signal at $2,340\text{ cm}^{-1}$ was observed only in sample treated with alkaline (Fig. 1). This was reported to be the N-H stretching of organic compounds.¹⁶ This suggested that organic compounds might be modified by alkaline treatment. The collagen in the bone was softened by alkaline treatment.² These results suggested that alkaline may solubilize collagen from the bone resulting in a reduction of protein content.

SEM

The microstructure of bone particle showed the smooth and compact structure when the bone was prepared by soaking in water. However, the rough and corrosive structures were observed when sample was treated with alkaline (Fig. 2). The alkaline solution solubilized collagen, imbedded at the bone surface, increasing porosity of the bone. The corrosive surface of tilapia bone powder was also documented after alkaline treatment.² This may explain why the alkaline-treated sample could re-adsorb water to the greater extent than that without alkaline. Fish bone particle with high porosity could enable calcium to be extracted easily when compare with the compact surface. Therefore, the alkaline treatment was selected for preparation of fish bone powder for calcium extraction.

Optimization of calcium extraction

The strong acid and weak acids were selected to evaluate the efficiency for calcium extraction from the tilapia bone powder. The results clearly showed that all acids could be used to extract calcium from the bone (Table 2). However, the sulfuric and acetic acids seemed to show the highest potential. Sulfuric acid was used to digest organic compounds prior to determine mineral components.¹⁷ However, application of sulfuric in the food system is quite limited. In contrast, acetic acid has been applied regularly in food system in the form of vinegar. Bone softening by curing with an acetic acid resulted in calcium liberation.¹⁸ Therefore, acetic acid was selected to be the suitable acid for study the effect of concentration on the extractability.

The effect of concentration of an acetic acid was investigated. An increase of acetic acid concentration resulted in higher extractability up to 0.25 M, which was comparable to that at 0.50 M (Table 3). However, further increasing of calcium extractability was not observed although the concentration of an acetic acid was increased until 1.0 M. Therefore, the suitable concentration was considered at 0.25 M. In addition, using lower acid concentration would be benefit for further application.

The suitable time for calcium extraction was evaluated up to 72 h. Extraction of calcium by acetic acid at 0.25 M from 1-48 h provided an increase in calcium extractability (Table 4). An increase of extraction time resulted in an increasing of calcium liberation from fish bone during curing with the vinegar.¹⁹ However, calcium extractability was not increased more significantly when the time was prolonged to 72 h. Moreover, prolonging the extraction time may promote the microbial growth due to the presenting of organic compounds. Therefore, the suitable time for calcium extraction was selected at 48 h.

Based on this study, an acetic acid at 0.25 M was used as the extracting solvent to extract calcium from fish bone. The calcium content in the extract was determined exactly by ICP-OES and found the total calcium content in the solution at 2,376 mg/L. This value could be calculated to be 59.28 mM. The bioavailability of calcium in this solution was evaluated base on the TGase assay. This value was much higher than reported previously when water was to extract calcium from tilapia bone.¹

Bioavailability of extracted calcium from tilapia bone

Since TGase is a calcium-independent enzyme, calcium ion is needed for full activation. In addition, calcium is required to add up in the reaction cocktail for determining the TGase activity.²⁰ The activity of partially purified TGase from red sea bream was not detected in the presence of ion chelator, EDTA.²¹ The ability of crude TGase from tilapia muscle to catalyze the amine (MDC) incorporation into the dimethylated casein (DMC) was used to evaluate TGase activity prior purification.²² Therefore, availability of soluble calcium extracted from fish bone by acetic acid (0.25 M) for 48 h for TGase would be an indicator

for bioavailability. The results from our study showed that TGase activity was almost not found in sample without addition of the soluble calcium. This confirmed that TGase is the calcium-dependent enzyme. In the presence of 500 nM of calcium, TGase activity increased markedly (Fig. 3). This result indicated that the ability of soluble calcium extracted from tilapia bone powder to activate TGase activity. In addition, an increase in calcium concentration resulted in an increasing of TGase activity. The soluble calcium extracted from tilapia bone powder by only water also activated crude TGase.¹ Calcium ion is reported to induce conformational changes of fish TGase. The phenomena allowed the active site of enzyme, generally buried inside, to bind with substrate.²³ This suggested that the soluble calcium in this study is in the free form. Thus, it is hypothesized to available for biological reaction.

Conclusion

Tilapia bone powder could be prepared by removing organic compounds by alkaline solution. The alkaline treatment provided the porous surface, facilitating the calcium extraction. The acetic acid was selected as the suitable acid due to the high extractability as well as the compatible to food applications. The suitable concentration and extraction time were optimized to be 0.25 M and 48 h. The concentration of the extracted calcium was observed at almost 60 mM when the bone was extracted at the suitable condition. Soluble calcium could activate crude TGase to catalyze the incorporation of synthetic amine into modified casein, suggesting the bioavailability.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank you the Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Nong Khai Campus, for all facilities. The special thanks are honored to Miss Alisa Phukiew and Miss Panamas Chantakul for optimization of calcium extraction. The “Indo-China Country Trade and Economic Research Sector” was acknowledged for the supportive fund. Financial support was partially from the Thailand Research Fund (TRF) through the Grant No. M5380082.

REFERENCES

1. B. Hemung, *IJBBB.*, **3**, 306 (2013).
2. K. Techochatchawal, N. Therdthai, S. Khotavivattana, *Asian J. Food and Ag-Ind.*, **2**, 539 (2009).
3. S. A. Tont, W. G. Percy, J. S. Arnoid, *Mar. biol.*, **39**, 191 (1997).
4. C. Piccirillo, M. F. Silva, R. C. Pullar, I. Braga da Cruz, R. Jorge, M. M. E. Pintado, P. M. L. Castro, *Mater. Sci. Eng. C.*, **33**, 103, (2013).
5. P. Phiraphinyo, S. Taepakpurenat, P. Lakkanatinaporn, W. Sunthornsuk, L. Suntornsuk, *Songklanakarin J. Sci. Tech.*, **28**, 327 (2005).

6. Y. Yin, G. He, *Sep. Purif. Technol.*, **61**, 148 (2008).
7. Y. C. Zhu, S. A. Huang, J. Bai, R. P. Liang, *Livest. Poult. Ind.*, **1**, 128 (2005).
8. P. H. Luu, M. H. Nguyen, *Tap ChiKhoa Coc Va Cong Nghe.*, **47**, 91 (2009).
9. M. Malde, S. Bugel, M. Kristensen, K. Malde, I. Graff, J. Pedersen. *Nutr. Metab.*, **7**, 61 (2010).
10. J. N. Richardson, M. T. Stauffer, J. L. Henry, *J. Chem. Ed.*, **80**, 65 (2005).
11. J. M. Tennyson, R. S. Winlers. *AOAC.*, **35**, 8 (2000).
12. J. Toppe, S. Albrektsen, B. Hope, A. Aksnes, *Comp. Biochem. Phys. B.*, **146**, 395 (2007).
13. C. Hellmich, F. J. Ulm, *J. Biomec.*, **35**, 1199 (2002).
14. M. Ishikawa, S. Mori, H. Watanabe, Y. Sakai, *J. Food Process. Pres.*, **13**, 123 (1988).
15. K. Prabakaran, S. Sajeswari, *Trend Biomater. Artif. Organs.*, **20**, 20 (2006).
16. V. Coman, R. Grecu, M. Baciut, G. Baciut, P. Prodan, V. Simon, *J. Optoelectron Adv. M.*, **9**, 3372 (2007).
17. G. F. Smith, H. Diehl, *Talanta.*, **3**, 41 (1959).
18. C. Shimosaka, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **31**, 9 (2002).
19. C. Shimosaka, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **26**, 173 (1998).
20. J. Takagi, Y. I. Saito, T. Kikuchi, Y. Inada, *Anal. Biochem.*, **153**, 295 (1986).
21. B. Hemung, E. C. Y. Li-Chan, J. Yongsawatdigul, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 7510 (2008).
22. A. Worratao, J. Yongsawatdigul, *Food Chem.*, **93**, 651 (2005).
23. H. Yasueda, Y. Kumazawa, M. Motoki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2041 (1994).

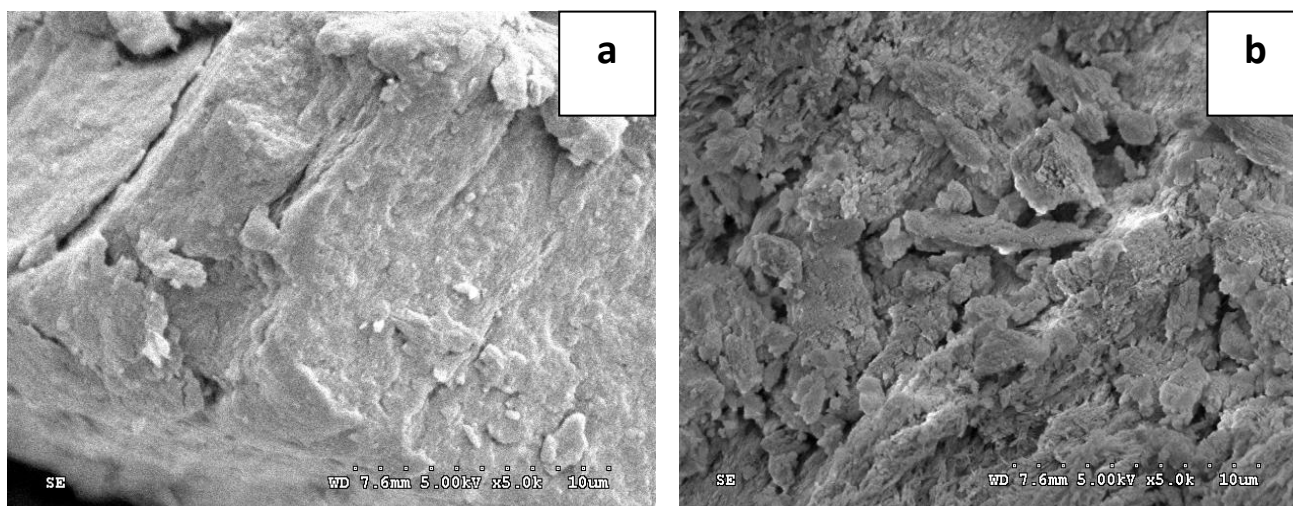


Fig. 1. Microstructure of tilapia bone powder treated with water (a) and alkaline (b)

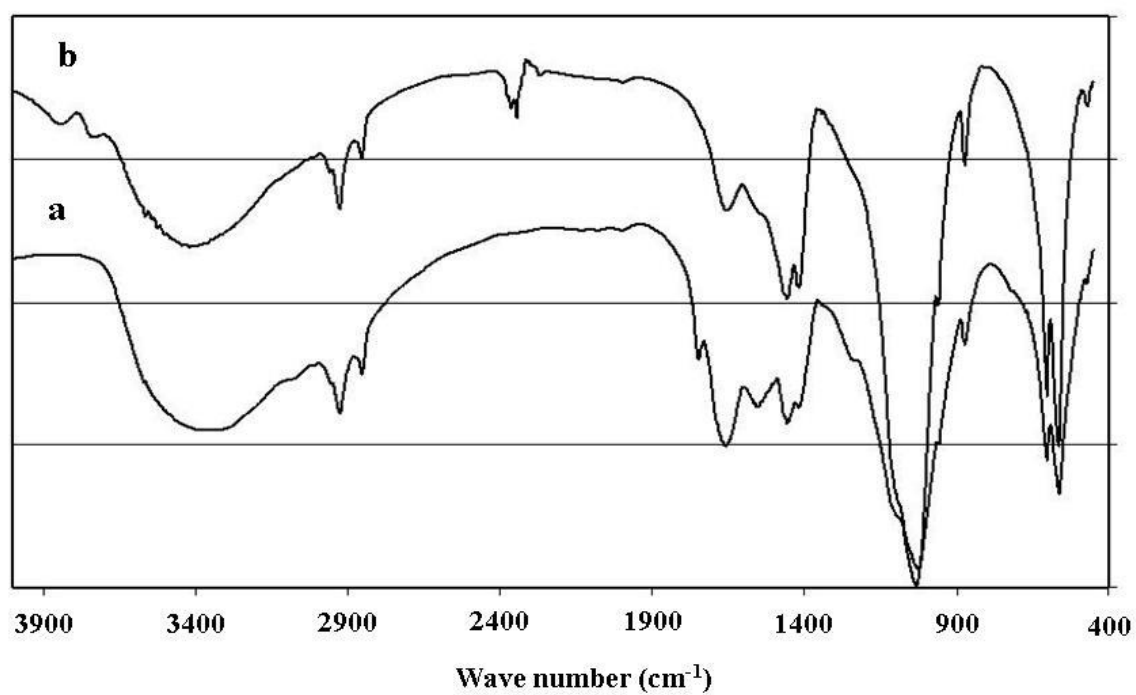


Fig. 2. FT-IR spectra of tilapia bone powder treated with water (a) and alkaline (b)

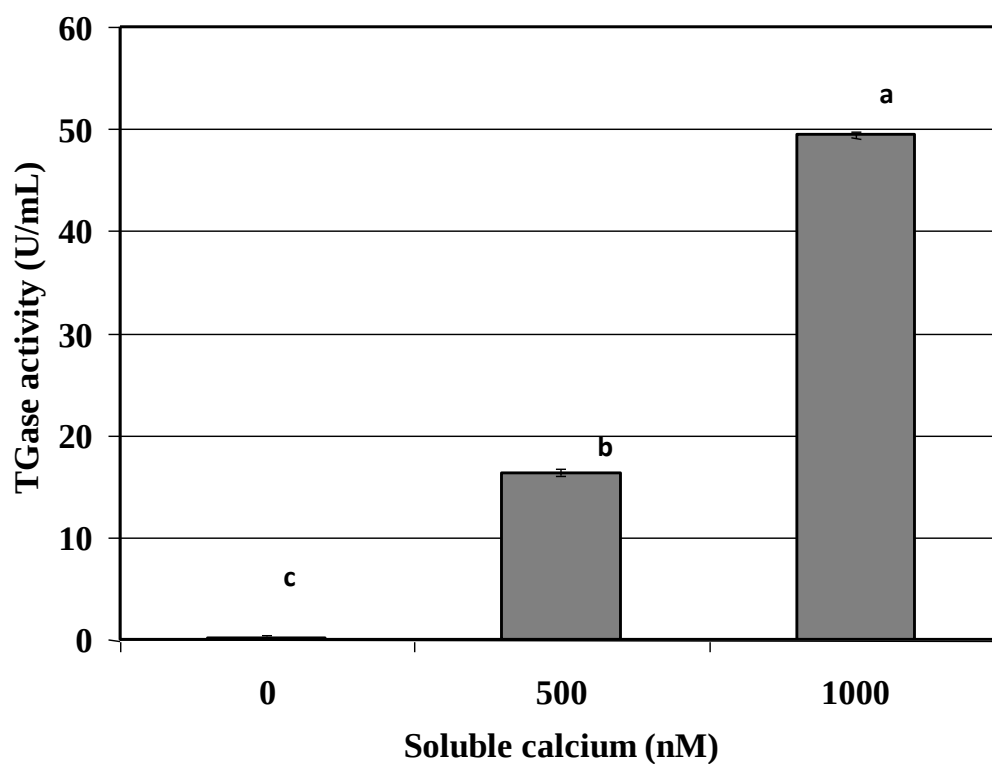


Fig. 3. TGase activity as affected by concentration of soluble calcium from tilapia bone powder extracted by an acetic acid (0.25 M) for 48 h at room temperature.

Table 1 Composition of tilapia bone powder treated with water and alkaline solution

Composition (%)	Treatments	
	Water	Alkaline
Moisture	1.82±0.16 ^b	2.67±0.26 ^a
Crude fat	6.96±0.11 ^a	3.12±0.04 ^b
Crude protein	21.46±0.20 ^a	17.77±0.20 ^b
Total ash	65.00±0.14 ^b	70.16±0.03 ^a

Different letters in the same column indicate the statistic difference ($P < 0.05$) between columns

Table 2 Calcium extraction from tilapia bone powder as affected by acid types

Acid type	Normalized extractability (%)
Sulfuric acid	63.16±0.24 ^{bc}
Hydrochloric acid	98.21±0.32 ^a
Nitric acid	71.80±0.31 ^b
Acetic acid	100.00±0.43 ^a
Citric acid	60.65±0.41 ^{bc}

Different letters among rows in the same column indicate the statistic difference ($P < 0.05$)

Table 3 Effect of an acetic acid concentration on calcium extractability from tilapia bone powder

Acetic acid concentration (M)	Normalized extractability (%)
0.03	51.80±0.21 ^d
0.06	79.11±0.32 ^{bc}
0.12	86.91±0.73 ^b
0.25	100.00±1.04 ^a
0.50	79.40±0.83 ^{bc}
1.00	91.47±0.41 ^b

Different letters among rows in the same column indicate the statistic difference ($P < 0.05$)

Table 4 Effect of the extraction time on the calcium extractability from tilapia bone powder by an acetic acid (0.25 M)

Extraction time (h)	Normalized extractability (%)
1	54.38 $\pm$ 0.29 ^{cd}
3	61.05 $\pm$ 0.43 ^c
6	54.86 $\pm$ 0.07 ^{cd}
12	49.98 $\pm$ 0.10 ^d
24	60.59 $\pm$ 0.45 ^c
48	94.30 $\pm$ 0.18 ^{ab}
72	100.00 $\pm$ 0.37 ^a

Different letters among rows in the same column indicate the statistic difference ($P < 0.05$)

To be submitted to

“Journal of Food Science”

Silver carp bone activated transglutaminase to improve qualities of fish emulsion sausage

¹Bung-Orn Hemung, ²Jirawat Yongsawatdigul, and ³Koo Bok Chin

¹*Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Nong Khai Campus,
Nong Khai 43000, Thailand*

²*School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of
Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

³*Department of Animal Science and Functional Foods Research Institute, College of
Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*

Corresponding authors: Dr. Bung-Orn Hemung

**e-mail: bunhem@nkc.kku.ac.th, hemung3@gmail.com*

ABSTRACT

Silver carp bone powder was prepared by soaking in the hot alkaline, autoclaved, dried, and ground to be powder. It appeared as white powder as indicated by high lightness value at 81.15, while the redness and yellowness were observed at 5.28, and 23.26, respectively. The proximate analysis revealed that total ash was the major component (64.45 %), suggesting the potential to be source of natural mineral particularly calcium. The total calcium content, analyzed by the inductive coupled plasma optical emission spectroscopy, was found at 32.02 % but the soluble calcium was observed at 0.59 %. That soluble calcium activated transglutaminase to catalyze the cross-linking of myofibrillar protein (MP) as evidenced by changes in MP patterns. Silver carp bone powder was incorporated into fish sausage at 1 % (w/w) prior being compared its qualities to the control. The addition of fish bone powder did not affect the moisture, fat, and protein contents. The ash content increased significantly and total calcium increased for 15 fold when comparing to the control. The color value was not changed when only lightness was considered. The yellowness and redness values were increased significantly. Texture profile analysis showed that the hardness and gumminess values of sample were improved by fish bone powder. The product acceptability, evaluated by consumer test, showed that incorporation of fish bone powder could increase the overall acceptance.

Key words: calcium; silver carp; transglutaminase, fish bone

INTRODUCTION

Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) is a variety of Asian common carp found in north and northeastern Asia. It is classified as a cyprinid fish, living in fresh water. The annual harvest was documented as the highest value in especially China and India (Liu et al., 2008). It is the good source of rich nutrients including protein, mineral, and lipid (Jin and Li, 1998). It is used as the raw material for processing into several products such as frozen fillet, frozen surimi. The bone of this fish needed to be removed during those processes, generating the waste or by-products. The fish bone is estimated for 15 % of the fish weight. It has been somehow processed into fried fish bone for human consumption but the production scale seemed to be unbalance to the generated amount. This carries the bordering cost for waste management. However, the bone is reported to be the source of natural mineral particularly calcium and phosphorous. Therefore, processing silver carp bone to be the nutritive ingredient is necessary to increase the value of fish bone. Chen et al (2006) reported that silver carp bone is rich in mineral. Production of silver carp bone into the powder has been performed using the superfine grinding technology but implication for being the source of mineral has not been focused (Wu et al., 2002). The potential of other fish bone, tilapia, as a source of mineral supplement was documented (Techochatchawal et al., 2009). However, production of fish bone powder as the mineral supplement has still limited commercially since the solubility is limited. This is because calcium in fish bone powder is mainly complexed with phosphorous as the hydroxylapatite form (HA). The bioavailability of the fish bone capsule might be limited.

Recently, Yin et al. (2014) produced fish bone in the nano scale and incorporated into surimi gel. It was found that the textural properties of surimi gel were improved by addition of fish bone. The functional properties of surimi gel were improved by addition of fish bone (Kim et al., 1998). The gelation of surimi was promoted by addition of calcium in the nano scale (Yin and Park, 2014). The improvement of textural properties was reported to be due to the available of soluble calcium from the bone. The calcium pound improved the textural properties has been established (Lee and Park, 1998) and believed to be the activator for the cross-linking enzyme, tissue transglutaminase (TGase). TGase is a calcium-dependent enzyme, catalyze the protein cross-linking through the covalent bond as so call 'isopeptide'. The enzyme is found normally in fish muscle. However, effect of fish bone on the qualities of emulsion gel from fish protein has not been reported, especially in the model of sausage. Therefore, the objectives of this study were to characterize the silver carp bone powder and evaluate its effect on the qualities of fish emulsion sausage.

Material and methods

Materials

The silver carp samples were obtained from a local market, Phochai market, in Nong Khai province, Thailand. The fish were kept in a foam-box covered with ice before transporting to the Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Nong Khai Campus within 1 h. Each fish was eviscerated manually upon arrival. The fish fillets without skin were ground using a mincer with a screen of 3 mm perforations (TC12-C; Champ; Kent, UK). This fish mince was used for myofibrillar protein extraction as well as sausage preparation. The main frame containing bone were kept frozen at -20°C until used to prepare the bone powder.

Bone preparation

Silver carp bone powder was prepared according to the method described previously with slight modification (Hemung, 2013). The main frame of silver carp was soaked in hot alkaline solution (0.8 % NaOH, w/v) and controlled the ratio of bone to solution at 1:2 (w/w) for 1 h before rinsing with water until the pH of flow through reach neutral pH. The bone samples were autoclaved at 121 °C (350 g.cm⁻²) for 1 h, and dried overnight in an oven at 105 °C. The dried samples were ground into powder and sieved through a 38 µm mesh and used as water-aid bone and alkaline-aid bone powders, respectively.

Bone characterization

Proximate analysis

The chemical compositions in the sausage were estimated using proximate analysis according to the methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, with the protein content based on the nitrogen content using the Kjeldahl method (Tennyson and Winlers, 2000) using a conversion factor of 6.25. The moisture content was determined by an oven drying at 105 °C until a constant weight of each sample was obtained (12 h). The crude fat content was determined by the Soxhlet extraction using petroleum ether as the solvent. Thermal combustion at 550 °C for 16 h in a muffle furnace was applied to determine the total ash content.

Color measurement

The samples were brought to room temperature and cut into lengths of 1.5 cm. The color of the cross-sectional area was evaluated using a colorimeter (JS555, Color Techno System, Japan). The color values were reported as the *L*, *a*, and *b* values were reported from three replications.

Total and soluble calcium content

The bone powder was digested with nitric acid (0.1 M) at 95 °C for 2 h before atomizing them by the inductively coupled, plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES; Optima 4300 DV; Perkin Elmer Instruments; Norwalk, CT, USA). The emission wavelength for

calcium was recorded at 317.933 nm and the calcium content in the extract was reported as total calcium in fish bone.

The bone powder was mixed with distilled water at the ratio of powder:water of 1:4. The mixture was kept shaking at 100 rpm for at 40 °C for 30 min. The obtained sample was centrifuged at 1000 rpm for 10 min at room temperature. Thereafter, the supernatant was filtered through the filter paper (Wattman® No. 1). The filtrate was collect for calcium determination using nitric digestion followed by ICP-OES as described above. This value was used as the soluble calcium content in fish bone.

Crude TGase activity determination

The silver carp (20 g) muscle was homogenized with 80 mL of an extraction buffer (10 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl., pH 7.5). The homogenate was centrifuged at 10, 000 × g for 30 min. All processes were controlled below 4 °C. The supernatant was filtered through the filter paper (Wattman® No. 1) and the filtrate was used as crude TGase.

In order to determine TGase activity, the cocktail reaction containing the DMC (2 mg/mL), Tris-Cl, pH 7.5 (70 mM), DMC (15 μM), and 100 uL of crude TGase, was prepared. The reaction was controlled at 37 °C for 10 min before stopping by addition of an ammonium sulfate to the final concentration of 400 mM. The fluorescence intensity of reaction was monitored using (F-2700 Hitachi, Japan) at excitation and emission wavelengths of 350 and 480 nm, respectively.

Cross-linking of myofibrillar protein

Myofibrillar protein (MP) was extracted from silver carp muscle using the previous method (Hemung and Chin, 2013). Fish mince (100 g) were homogenized with 400 mL of the washing buffer (10 mM NaCl, 50 mM phosphate buffer, pH 6.5). In order to eliminate the sarcoplasmic protein, the homogenate was centrifuged at 1,000 × g for 10 min and discarded the supernatant. The pellet was collected to further eliminate SP by repeating the previous process twice. Finally, the residue pellet was homogenized with 100 mL of 0.6 M NaCl, pH 6.5 before being filtered through the 3 layers of cheese cloth. The filtrate was mixed with 0.1 M NaCl, pH 6.5 before being centrifuged at 1,000 × g for 15 min. The pellet was used as fish MP. The protein content was determined by the Biuret method and the bovine serum albumin was used as standard.

Cross-linking reaction was determined by mixing MP with crude TGase at the ratio of MP: TGase of 1:4 in the presence and absence of 500 nM of soluble calcium from silver carp bone powder. The NaCl in the cross-linking reaction was controlled at 2 %. The reaction mixture was incubated at 40 °C for 30 min. Then, SDS solution was added into the cross-linking reaction to the final concentration of 5% and the mixture was boiled for 5 min. The supernatant obtaining from centrifugation at 1,000 × g was collected for protein determination as well as protein patterns.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The cross-linking proteins were mixed with Laemmli buffer containing reducing agent in order to destroy the disulfide bond before analyzing their patterns by SDS-PAGE according to the method of Laemmli (1970) with slight modifications. The stacking and separating gels were 4 and 10%, respectively. The protein in each sample (20 μ g) was separated under constant voltage 100 V at room temperature. The protein bands were stained with Coomassie brilliant blue and compared the molecular weight with the broad range standard.

Sausage preparation

The emulsion sausage was prepared using a similar recipe to the Bologna style (Chin *et al.*, 1999) with slight modifications. The fat content was reduced by the fat replacer, which is the gel obtaining from konjac flour and carrageenan. The fat replacer was prepared by mixing konjac flour (5 g) and carrageenan (5 g). Then, the mixture was homogenized with 100 mL of water to obtain the gel. The sausage recipe was controlled the amounts of silver carp mince, fat replacer, soy bean oil, salt, corn flour, sugar and mixed spices at 50, 10, 10, 2, 3, 3, and 2%, respectively. The fish bone was incorporated into the recipe at 1% in the treatment, while the control was not added. To prepare the sausage, fish mince was chopped with other ingredients using a chopper (Champ; Kent, UK) and the temperature of the batter was below 12 °C. The batter was stuffed into a 25 mm diameter collagen casing (Nippi Corp.; Yokohama, Japan) using sausage stuffer. The raw sausage was incubated at 40 °C for 30 min and subsequently cooked in the controlled temperature of a water bath (Memmert, GmbH; Schwabach, Germany) at 80 °C for 30 min. Samples were then cooled down immediately by soaking in iced water and kept in a refrigerator (4 °C) overnight.

Analysis of sausage

Color measurement

The samples were brought to room temperature and cut into lengths of 1.5 cm. The color of the cross-sectional area as described above. The color value (L , a , b) were reported as average value from 3 measurements.

Proximate analysis

The chemical compositions in the sausage were estimated using proximate analysis according to the methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists as the detailed in the proximate analysis of fish bone.

Texture profile analysis (TPA)

The sausage was cut into rectangular pieces (1 × 1 × 1.5 cm) to remove the collagen casing. The TA-XT2 equipment (Micro Stable Systems; Godalming, UK) was used to perform the TPA using the cylindrical probe with the diameter of 25 mm. The pre- and post-speeds were both fixed at 5 mm.s⁻¹. The samples were compressed in two consecutive cycles until

they reached 75% of the original sample height with a 2 s interval between cycles. The TPA parameters were calculated from nine measurements.

Sensory evaluation

The sensory evaluation was performed untrained panelists (60 panelists). The sausage samples were cut into 1.5 cm cubes before boiling for 1 min and three pieces for each treatment were served. The sensory attributes, consisting of appearance, color, flavor, texture and overall acceptance, were evaluated by a nine-point scale.

Statistical analysis

The difference between means in each treatment was performed using the *t*-test and the significant difference was considered at the level of 95% ($P < 0.05$) using the SPSS 16.0 software package (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

Results and Discussion

Chemical compositions

Moisture content was found in the bone powder although it appeared as the dried powder (Table 1). The monolayer water molecule may bind tightly to the bone structure and they are hard to remove completely by oven drying. In addition, water molecule may re-adsorb during storage of fish bone. This value was slightly higher to that reported previously for tilapia bone powder when the similar procedure was applied (Hemung, 2013). However, moisture content of our bone powder was much lower than that reported by Toppe et al. (2007).

Protein content in this sample was similar to that in tilapia bone powder (Hemung, 2013). However, it was lower than that reported previously for cod, saithe, blue whiting, salmon, trout, herring and mackerel (Toppe et al., 2007). They found that protein in fish bone were at the range of 26-41 %. This may be the different method for eliminating the fish flesh in the bone. Alkaline solution was used in our study, only hot water was applied previously. It has been establish that collagen was the major protein found in bone matrix (Hellmich et al., 2002). Softening of connective tissue from fish bone under alkaline condition has been reported (Ishikawa et al., 1988). Thus, the alkaline treatment allows collagen to be removed more effectively than water. However, pretein residues could not be removed completely as evidenced by presenting of protein in the sample. This might be because the collagen may be imbedded inside of the mineral crystal as model proposed previously (Hellmich et al., 2002). Crude fat was eliminated almost completely from the bone as evidenced by a low fat content (Table 1).

Total ash content was increased found as the major component accounting for 73 %, which is comparable to that of tilapia bone powder as reported previously (Hemung, 2013). This was higher than that found in cod, saithe, blue whiting, salmon, trout, herring and

mackerel by Toppe et al. (2007). This was because the organic matters, protein and fat, in our study were eliminated more perfectly than that previous work. Since the ash content was considered as the major composition in the bone, it had a potential to be the source of natural mineral, especially calcium.

Total and soluble calcium

Total calcium content in the bone powder was about 32 %, which is a half lower than the total ash content (Table 1). This suggested that there is not only calcium constituting in the bone powder. It has been reported that phosphorous is also presented in the bone and the calcium:phosphorous ratio was at about 1.67 (Boutinguiza et al., 2012). The calcium and phosphorous are also complex to each other in the form of calcium hydroxyapatite (HA) as assessed by the vibrational spectroscopy (Coman et al., 2007) and X-ray diffraction spectroscopy (Prabakaran and Rajeswari, 2006). This HA complex is hard and also considered as the ceramic material (Szpak, 2011). Thus, the free calcium is hard to obtain from fish bone although it is rich in calcium content. However, water soluble calcium was still observed when the bone was mixed with water although the low content was observed at only 0.19 % (Table 2). The bone preparation method by alkaline solution and softening in the autoclave condition in this study allowed the calcium in the bone to be extracted. The tilapia bone particle was observed as corrosive surface when the alkaline treatment is applied (Techochatchawal et al., 2009). Changes in chemical composition and calcium liberation from fish bone were observed after cooking at high temperature (Shimosaka, 1998). The free calcium, liberated from fish bone, would be available for biochemical reaction as well as promote the functional properties in food system.

TGase activity

The results from our study showed that TGase activity was not found in sample without addition of the soluble calcium (Fig. 2). The activity of partially purified TGase from red sea bream was also not detected in the presence of ion chelator, EDTA (Hemung and Yongsawatdigul, 2008), which is similar to the finding for the purified tilapia TGase reported by Worratao and Yongsawatdigul (2005). In the presence of 500 nM of calcium, TGase activity increased markedly. This suggested that TGase is the calcium-dependent enzyme. Moreover, further increasing of activity was observed when the soluble calcium was added up to 1000 nM. This result indicated the soluble residue of calcium from silver carp bone powder is able to activate TGase to catalyze the amine incorporation into modified casein. The soluble calcium extracted from tilapia bone powder by only water was enough to activate crude tilapia TGase as indicated by TGase activity determination (Hemung, 2013). It has been established that TGase is a calcium-independent enzyme and calcium ion is needed for full activation (Folk, 1980). Calcium ion is reported to induce conformational changes of fish TGase and thus allowed the active site of enzyme, generally buried inside,

to bind with substrate (Yasueda et al., 1995). In addition, calcium is required to add up in the reaction cocktail for determining the TGase activity (Takagi et al., 1986). This suggested that the soluble calcium in this study is in the free form and available for biological reaction.

Cross-linking of MP

Changes in protein pattern of silver carp MP incubated with crude TGase in the presence and absence of soluble calcium from silver carp bone powder are shown in Figure 3. The results indicated that the patterns of MP without incubation and MP incubated with crude TGase without soluble calcium were not different. The major protein component were myosin heavy chain (MHC) and actin, which were found at molecular weight of about 200 and 45 kDa, respectively. However, a decrease in MHC intensity concomitant with the appearance of protein with higher molecular weight at stacking gel was observed. This suggested that soluble calcium activated crude TGase to catalyze MHC cross-linking. The cross-linking of threadfin bream MHC by the partially purified TGase from threadfin bream liver in the presence of calcium ion of about 5 mM has been reported (Hemung et al., 2008). Our results indicated that soluble calcium from silver carp bone powder was enough to activate TGase to catalyze the cross-linking of fish MP. Calcium availability from Pacific whiting bone powder was reported to activate the TGase in Alaska pollock surimi to catalyze its protein cross-linking (Yin and Park, 2014). Therefore, addition of fish bone powder in to fish protein gel would likely promote the functional properties by improving the textural properties through protein cross-linking.

Sausage quality

Proximate analysis

The addition of fish bone powder for 1 % did not affected the moisture, fat, and protein content of the sausage as the results shown in Table 4. However, the total ash content increased significantly up to 60 % when fish bone was added, suggesting high mineral content upon adding fish bone powder. The total calcium content in control and fish bone fortified sausages were found at 0.079 and 1.178 % (dried basis), respectively. This suggested that addition of fish bone powder could increase calcium content in the product for approximately 15 fold. These values could be calculated to be 0.025 and 0.392 % or 25 and 392 mg/ 100 g sausage, based on the wet basis. Based on this value, the sausage sample in this study could be classified as high calcium product since the calcium content is higher than 20 % of recommended amount by the Thai Recommended Daily Intakes (Thai RDI). The fortified calcium through the addition of fish bone powder would play a clinical role for human. The bioavailability of calcium from bone has been reported, based on the *vitro* system (Sittikulwitit et al., 2004). In addition, the calcium from salmon and cod

bone has been reported to be well absorbed in young healthy men (Malde et al., 2010). Based on these studies, addition of fish bone powder into fish sausage provided the benefit by promoting this sausage to be a high calcium product.

Color

The color of fish sausage was evaluated since it is considered as one of the quality attributes. This color appearance is also important for consumer perception. The results indicated that the sausage turned to be more colorful than the control when fish bone powder was added. This was evidenced by an increase in redness and yellowness of the sample (Figure. 4). An increase in redness and yellowness may from the browning pigments in the bone powder, generating from protein and fat. The results in this study were different from that reported by Yin et al. (2014). They reported that addition of fish bone in protein gel (surimi gel) resulted in a reduction of whiteness. The different effects may from different systems (protein gel and emulsion gel). The results from this study led us to hypothesize that the products would be accepted at the higher preference level than the control. Therefore, fish bone fortification into sausage provided not only high calcium content but also improved the color appearance.

Texture profile analysis

The texture profile of samples was analyzed based on the chewing behavior. The results clearly showed that the hardness and gumminess were increased significantly upon addition of fish bone powder. However, other textural properties were not changed. This suggested that the textural properties of fish sausage were improved by addition of fish bone powder. The gelling properties of surimi gel from the Alaska Pollock were promoted by the addition of fish bone powder and such improvement was found regarding to the particle size (Yin et al., 2014). They reported only fish bone at nano-scale could improve the texture of surimi gel. This was reported to be the action of available calcium from the bone. In addition, fish bone at nano scale also promoted the gelation process of surimi as assessed by the dynamic rheology (Yin and Park, 2014). The calcium compounds improved texture of surimi gel (Lee and Park, 1998). Our results indicated that the bone at micro scale could also be used as the additive to improve the textural properties of sausage. This might be due to the different treatments during the bone preparation. Although the organic matters were removed by alkaline solution, softening of the bone at high temperature under autoclave condition was not performed in previous study. However, our bone was treated with both alkaline and autoclave. Therefore, our bone sample would be more feasible to liberate calcium liberation as evidenced by the presentation of soluble calcium (Table 3) even though it is in the micro scale. The calcium from bone powder could improve the texture of sausage by inducing the changes of fish protein conformation. Such

changes promote protein-protein interactions via hydrophobic interactions and disulfide bond. Calcium induced changes in myosin and actin, resulting in protein aggregation (Hemung and Yongswatdigul, 2005). In addition, thermal aggregation of an actomyosin from tilapia muscle was induced by addition of calcium (Yongswatdigul and Sinsuwan, 2007).

It has been reported that TGase is normally presented in several fish species. Purification and characterization of fish transglutaminase were done (Binsi and Shamasundar, 2012). All of identified TGase from fish muscle is the calcium-dependent enzyme. The soluble calcium, liberated from fish bone powder, may activate the TGase to catalyze cross-linking of protein in sausage. Cross-linking of silver carp protein by the action of crude TGase from silver carp in the present of soluble calcium from fish bone was established (Figure 3). This would lead to improvement of textural properties. The similar phenomenon was reported in the Alaska pollock (Yin et al., 2014). Therefore, addition of fish bone into fish sausage provided more benefit by improving textural properties.

Sensory evaluation

The fish sausage was accepted by consumer since the sensorial score was higher than a half of the full scale (5 of 9). Moreover, addition of fish bone powder resulted in an increase the overall acceptance (Table 5). The color and texture were improved by addition of fish bone powder when each quality attribute is considered. This result suggested that the different color and texture, assessed by the instrument, correlated well with the perception of consumer. It has been reported that incorporation of fish bone at micro scale into surimi gel resulted in the discontinuous gel structure (Yin et al., 2014). However, the present of calcium in the sausage recipe did not affect the perception of the consumer. This suggested the possibility to launch commercially this product.

Conclusion

Silver carp bone powder showed the white powder consisting of mineral as the highest portion, suggesting the potential to be natural mineral source, especially calcium. Most of calcium was presented as the water insoluble and soluble calcium was observed at low concentration. However, such soluble calcium could activate TGase to catalyze protein cross-linking. Incorporation of fish bone powder (1 %) into sausage turned it into high calcium sausage. The sausage was reported to be more colorful as increasing of redness and yellowness. The textural properties of fish sausage were improved no matter evaluated by texture profile analysis or consumer test.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank you the Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Nong Khai Campus, for all facilities. Financial support was from the Thailand Research Fund (TRF) through the Grant No. M5380082.

REFERENCES

- AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis*, 17th ed. Association of Official Analytical Chemist, Maryland.
- Binsi PK, Shamasundar BA. 2012. Purification and characterization of transglutaminase from four fish species: Effect of added transglutaminase on the viscoelastic behavior of fish mince. *Food Chem.* **132**:1922-1929.
- Barakat NAM, Khil M, Omran AM, Sheikh FA, Kim HY. 2009. Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *J. Mater. Process. Tech.* **209**:3408-3415.
- Boutinguiza M, Pou J, Comesana R, Lusquinos F, de Carlos A, Leon B. 2012. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Mater. Sci. Eng. C.* **32**:478-486.
- Chin KB, Keeton JT, Longnecker MT, Lamkey JW. 1999. Utilization of soy protein isolate and konjac blends in a low-fat bologna (Model system). *Meat Sci.* **53**:45-57.
- Chen J, Xiong SB, Li J, Shi Y. 2006. Study on enzymatic hydrolysis condition of protein in silver carp bone. *Food Sci.* 27(11):326-330.
- Coman V, Grecu R, Baciut M, Baciut G, Prodan P, Simon V. 2007. Investigation of different bone matrices by vibrational spectroscopy. *J. Optoelec. Advanced Mater.* **9(11)**:3372-3375.
- Fan L, Chen JP, Xiong SB, Yang WH. 2008. Effect of ball-milling treatment on physico-chemical properties of Silver carp bone powder. *Chinese J. Food Sci.* **29(9)**: 70-73.
- Folk JE. 1980. Transglutaminase, *Ann. Review in Biochem.* **49**:517-531.
- 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. *Fish Sci.* **61(3)**: 517-520.
- Hellmich C, Ulm FJ. 2002. Are mineralized tissues open crystal foams reinforced by cross-linked collagen?- Some energy arguments. *J. Biomechanics.* **35**:1199-1212.
- Hemung B, Yongsawatdigul J. 2008. Partial purification and characterization of transglutaminase from threadfin bream (*Nimipterus sp.*) liver. *J. Food Biochem.* **32**:182-200.
- Hemung B, Li-Chan ECY, Yongsawatdigul J. 2008. Reactivity of fish and microbial transglutaminases on glutaminy sites of peptides derived from threadfin bream myosin. *J. Agric. Food Chem.* **56**:7510-7516.
- Hemung B, Chin KB. 2013. Effects of fish sarcoplasmic proteins on the properties of myofibrillar protein gels mediated by microbial transglutaminase. *LWT - Food Sci. Tech.* **53**:184-190.
- Hemung B. 2013. Properties of tilapia bone powder and its calcium bioavailability based on transglutaminase assay. *IJBBS.* **3(4)**:306-309.

- Hemung B, Yongsawatdigul J. 2005. Ca^{2+} affects physicochemical and conformational changes of threadfin bream myosin and actin in a setting model. *J. Food Sci.* **70(8)**:455-460.
- Ishikawa M, Mori S, Watanabe H, Sakai Y. 1988. Softening of fish bone: Effect of acetic acid on softening rate and solubilization rate of organics matter from fish bone. *J. Food Process. Preserv.* **13(2)**:123-132.
- Jager I, Fratzl P. 2000. Mineralized collagen fibrils: A mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophys. J.* **79**:1737-1746.
- Jin QH, Li GL. 1998. Research on nutrition of Chinese silver carp. *Food Sci.* **19(8)**: 41-43.
- Kim SK, Park PJ, Byun HG, Je JY, Moon SH. 2003. Recovery of fish bone from hoki (*Johnius belengeri*) frame using a proteolytic enzyme isolated from mackerel intestine. *J. Food Biochem.* **27**:255-266.
- Kim JS, Yeum DM, Joo DS. 1998. Improvement of the functional properties of surimi gel using fish bone. *Agric. Chem. Biotech.* **41(2)**:175-180.
- Lee N, Park JW. 1998. Calcium compounds to improve gel functionality of Pacific whiting and Alaska Pollock surimi. *J. Food Sci.* **63(6)**:969-974.
- Liu H, Yin L, Zhang N, Li S, Ma C. 2008. Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening. *Food Chem.* **110**:310-318.
- Malde M, Bugel S, Kristensen M, Malde K, Graff I, Pedersen J. 2010. Calcium from salmon and cod bone is well absorbed in young healthy men: a double-blinded randomized crossover design. *Nutr. Metab.* **7(1)**:61-69.
- Miura T, Nakano M. 1998. Calcium bioavailability of total bone extract (TBE) and its effects on bone metabolism in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**:1307-1321.
- Phiraphinyo P, Taepakpurenat S, Lakkanatinaporn P, Sunthornsuk W, Suntornsuk L. 2005. Physical and chemical properties of fish and chicken bones as calcium source for mineral supplements. *Songklanakarin J. Sci. Tech.* **28(2)**:327-335.
- Prabakaran K, Sajeswari S. 2006. Development of hydroxyapatite from natural fish bone through heat treatment. *Trends in Biomater. Artif. Organs.* **20(1)**:20-23.
- Shimosaka C. 1998. Changes in chemical composition and crystalline structure in fish bone during cooking. *J. Clin. Biochem. Clin. Nutr.* **26**:173-182.
- Sittikulwitit S, Sirichakwal PP, Puwastien P, Chawasit V, Sungpuag P. 2004. In vitro bioavailability of calcium from chicken bone extract powder and its fortified products. *J. Food comp. Anal.* **17**:321-329.
- Szpak P. 2011. Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *J. Archaeologic. Sci.* **38**:3358-3372.
- Takagi J, Saito Y, Kikuchi T, Inada Y. 1986. Modification of transglutaminase assay: use of ammonium sulfate to stop reaction. *Anal. Biochem.* **153(2)**:295-298.

- Tont SA, Pearcy WG, Arnoid JS. 1977. Bone structure of some marine vertebrates. *Mar. Biol.* **39**:191-196.
- 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. *Comp. Biochem. Physiol.B.* **146**:395-401.
- Weiner S, Traub W. 1995. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Lett.* **206**:262-266.
- Worratao A, Yongsawatdigul J. 2005. Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chem.* **93**:651-658.
- Wu G, Zhang M, Wanga Y, Mothibe K, Chen W. 2012. Production of silver carp bone powder using superfine grinding technology: suitable production parameters and its properties. *J. Food Eng.* **109(4)**:730-735.
- Yin T, Park JW. 2014. Effects of nano-scaled fish bone on the gelation properties of Alaska pollock surimi. *Food Chem.* **150**:463-468.
- Yin T, Reed ZH, Park JW. 2014. Gelling properties of surimi as affected by the particle size of fish bone. *LWT-Food Sci. Tech.* **58**:412-416.
- Yongsawatdigul J, Sinsuwan S. 2007. Aggregation and conformational changes of tilapia actomyosin as affected by calcium ion during setting. *Food Hydrocolloid.* **21(3)**:359-367.

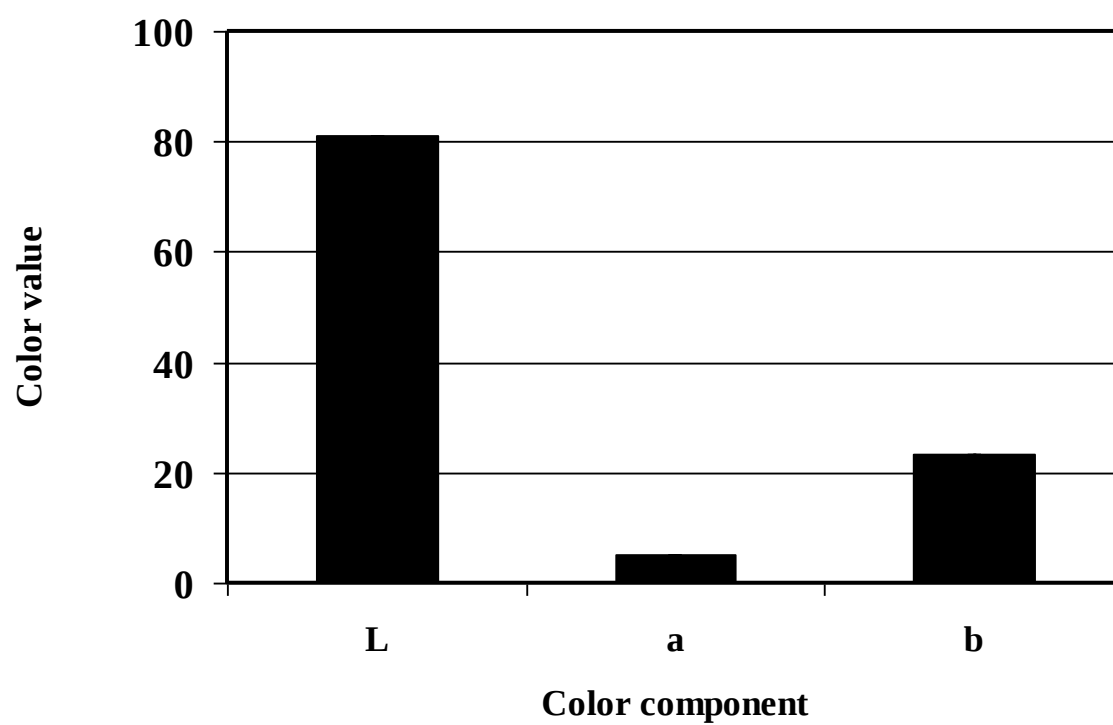


Figure 1. Color value of silver carp bone powder

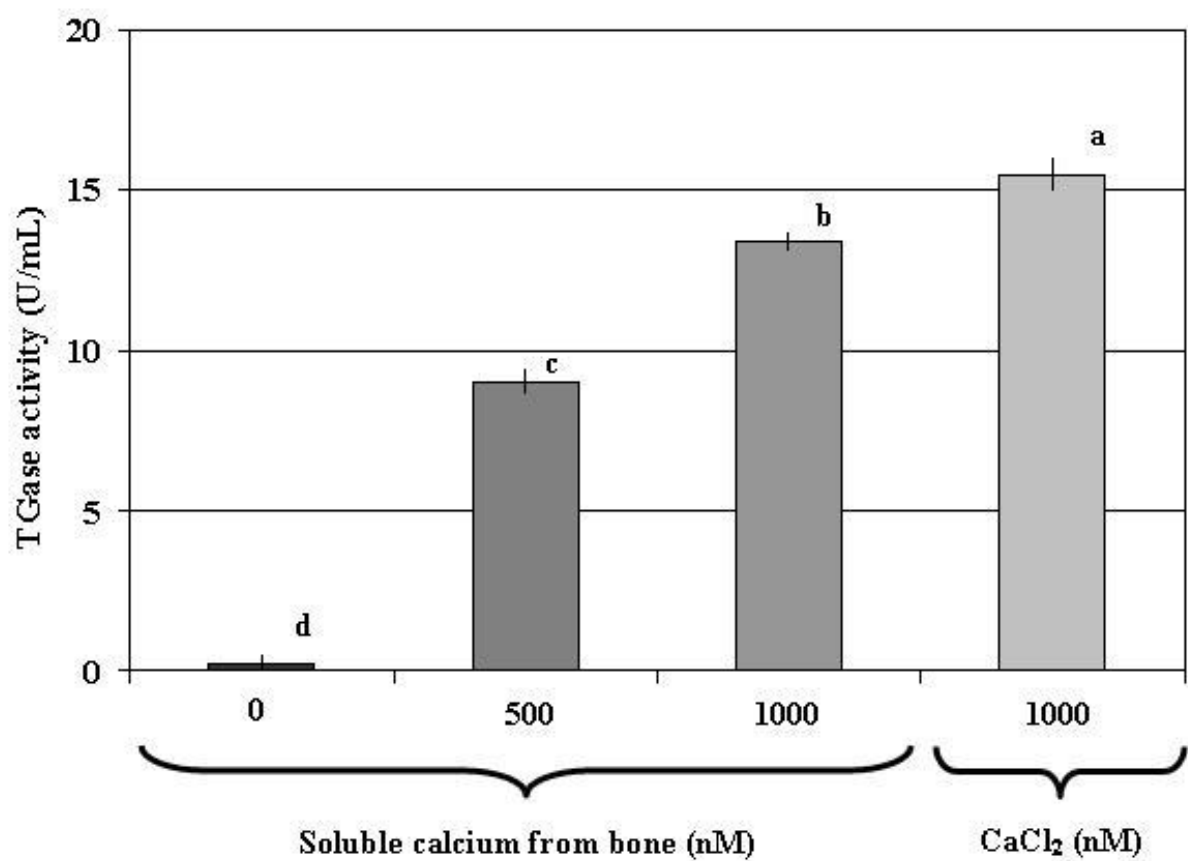
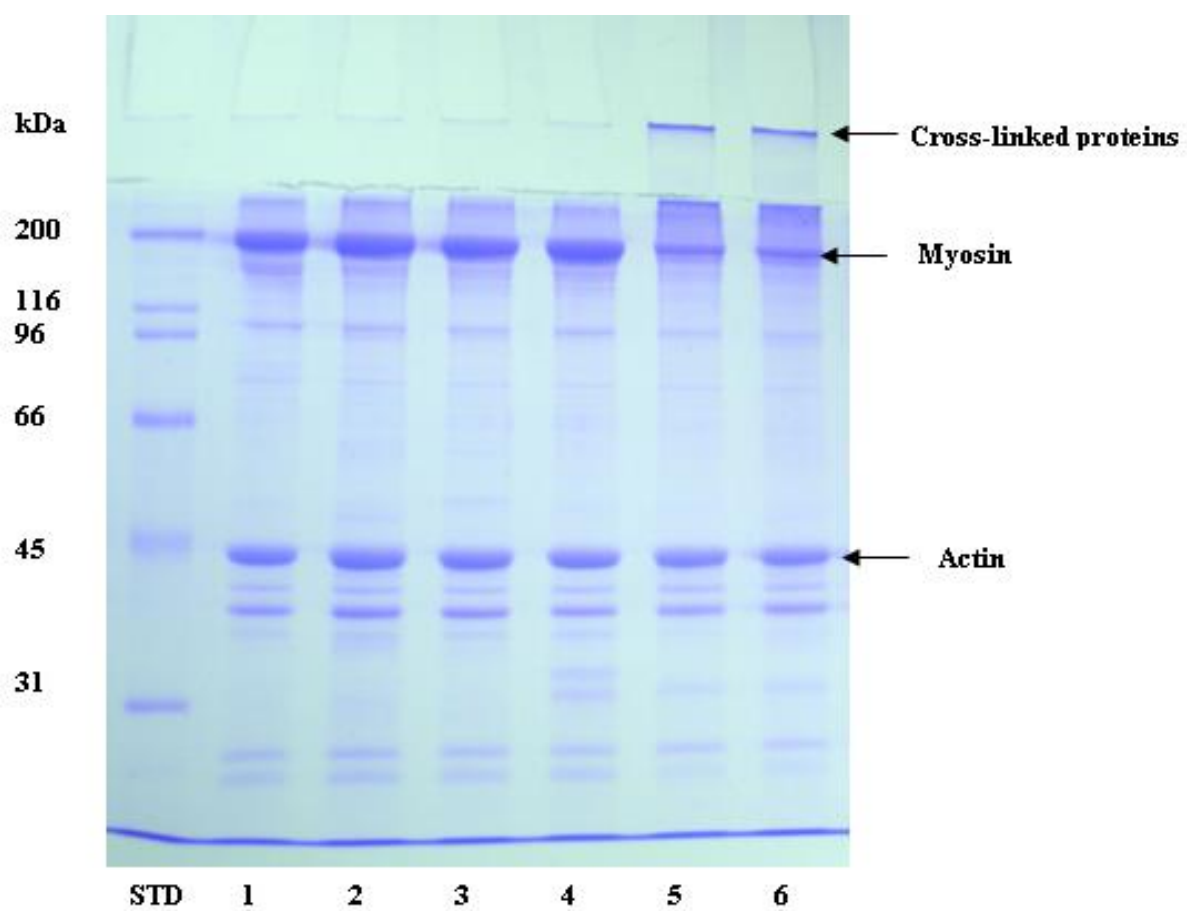


Figure 2. TGase activity as affected by soluble calcium from fish bone and CaCl₂



1, 2 = MP

3, 4 = MP + crude TGase

5, 6 = MP + crude TGase + soluble calcium

Figure 3. SDS-PAGE pattern of silver carp MP incubated with crude TGase in the presence and absence of soluble calcium from silver carp bone.

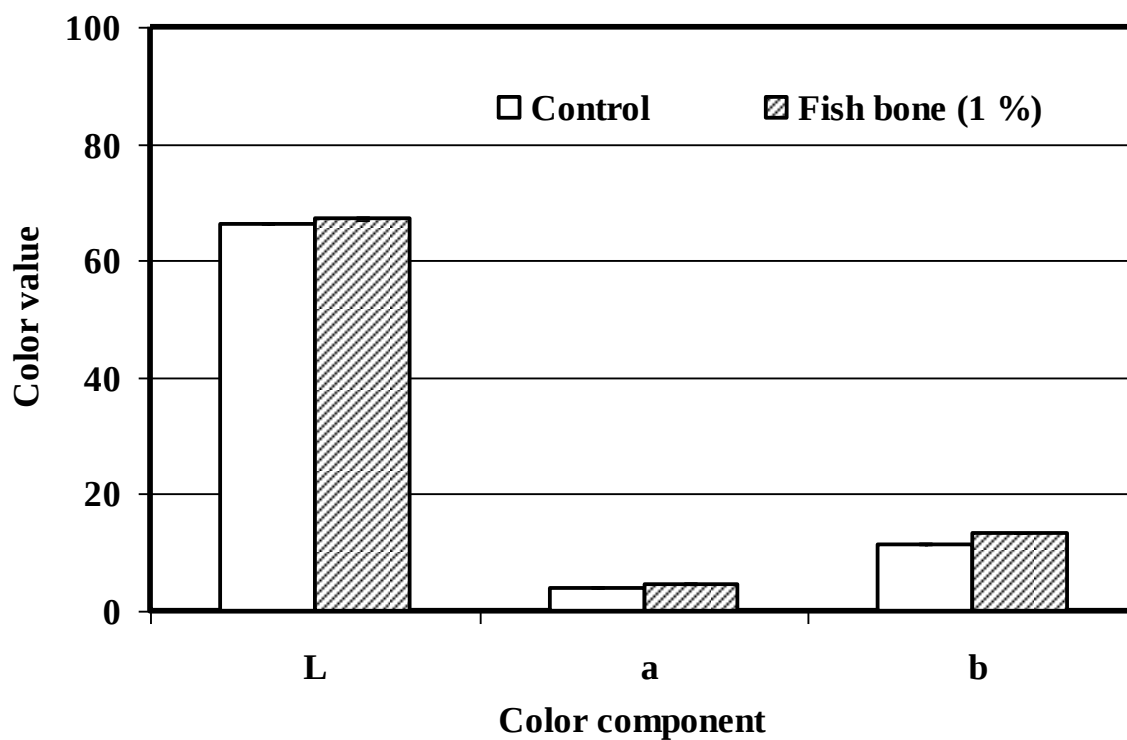


Figure 4. Color of fish sausage with and without fish bone powder (1 %).

Table 1 Chemical composition of silver carp bone powder

Composition	Amount (%)
Moisture	4.94 ± 0.16
Crude protein	13.27 ± 0.15
Crude fat	0.12 ± 0.07
Total ash	73.47 ± 0.18

Table2 Calcium content in silver carp bone powder

Calcium type	Amount (%)
Total calcium	32.02
Soluble calcium	0.19

Table 3 Chemical composition of fish sausage with/without fish bone powder

Chemical composition	Type of sausage	
	Control	Fish bone (1 %)
Moisture	67.38 ± 0.15^{ns}	66.74 ± 0.29^{ns}
Crude protein	7.78 ± 0.27^{ns}	8.18 ± 0.29^{ns}
Crude fat	13.47 ± 0.05^{ns}	13.82 ± 0.05^{ns}
Total ash	1.11 ± 0.10^b	1.77 ± 0.09^a
Total calcium	0.025	0.392

*a-b difference letters indicate the statistical difference (P < 0.05)

Table 4 Texture profile analysis of fish sausage with and without fish bone powder (1 %)

Textural properties	Type of sausage	
	Control	Added fish bone (1 %)
Hardness (kg	0.425 ± 0.115^b	0.655 ± 0.083^a
Adhesiveness (kg.s)	0.004 ± 0.003^{ns}	0.005 ± 0.003^{ns}
Springiness (s)	0.348 ± 0.132^{ns}	0.341 ± 0.095^{ns}
Cohesiveness	0.297 ± 0.074^{ns}	0.303 ± 0.083^{ns}
Gumminess (kg	0.129 ± 0.057^b	0.201 ± 0.089^a

*a-b difference letters indicate the statistical difference (P < 0.05)

Table 5 Sensory evaluation of fish sausage with and without fish bone powder (1 %)

Preferential attributes	Type of sausage	
	Control	Control
Appearance	5.73 ± 1.43^{ns}	5.97 ± 1.46^{ns}
Color	5.68 ± 1.65^b	6.06 ± 1.66^a
Texture	5.74 ± 1.57^b	6.06 ± 1.61^a
Taste	5.59 ± 1.65^{ns}	5.60 ± 2.09^{ns}
Overall acceptance	6.02 ± 1.67^b	6.21 ± 1.85^a

*a-b difference letters indicate the statistical difference (P < 0.05)