



วิทยานิพนธ์

คอลลาเจนจากเกล็ดปลา: การสกัดและคุณสมบัติบางประการ

**FISH SCALE COLLAGEN: EXTRACTION AND PARTIAL
CHARACTERIZATION**

นางสาวฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)
ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง คอลลาเจนจากเกล็ดปลา: การสกัดและคุณสมบัติบางประการ

Fish Scale Collagen: Extraction and Partial Characterization

นามผู้วิจัย นางสาวฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณิ จิรภาคย์กุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุลย์ สัจจอนันต์กุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจจงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

คอลลาเจนจากเกล็ดปลา: การสกัดและคุณสมบัติบางประการ

Fish Scale Collagen: Extraction and Partial Characterization

โดย

นางสาวฉลอมขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรจารย์การอาหาร)

พ.ศ. 2551

ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์ 2551: คอลลาเจนจากเกล็ดปลา: การสกัดและคุณสมบัติ
บางประการ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขา
วิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ, Ph.D. 116 หน้า

องค์ประกอบหลักของเกล็ดปลากะพงแดงและเกล็ดปลานิล คือ โปรตีน และเถ้า เพื่อให้ได้
เกล็ดปลาที่มีปริมาณโปรตีนสูงจึงทำการศึกษาวิธีการกำจัดแคลเซียม ซึ่งพบว่า การแช่เกล็ดปลาในกรด
ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.2 N เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะทำให้เกล็ดปลามีปริมาณเถ้าเหลืออยู่น้อยกว่า 1% ของ
น้ำหนักแห้ง จากนั้นนำเกล็ดปลาที่กำจัดแคลเซียมมาศึกษาขั้นตอนการสกัดคอลลาเจน ซึ่งประกอบด้วย
การสกัด 2 ขั้นตอน คือ การสกัดด้วยกรดอะซิติกพร้อมกับความร้อน ตามด้วยการสกัดด้วยกรดอะซิติก
ร่วมกับเอนไซม์เปปซิน โดยศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรด ความเข้มข้นของเอนไซม์
อุณหภูมิ และเวลาในการสกัดทั้ง 2 ขั้นตอน พบว่า ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ และ/
หรือปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน โดยวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงสุด และได้เปป
ไทด์ขนาดเล็ก คือ การสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง โดยใช้
อัตราส่วนเกล็ด:กรดเป็น 1:5 (w/v) ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์ความเข้มข้น 2.5% ของ
น้ำหนักเกล็ดปลาแห้งภายหลังการกำจัดแคลเซียม ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
จากนั้นนำสารสกัดคอลลาเจนไปหมუნเหวี่ยงผ่านเมมเบรน (ความสามารถในการกรองแยกอนุภาคที่มี
ขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa) ที่ความเร็ว 2,400 x g เป็นเวลา 30 นาทีต่อรอบ จำนวน 3 รอบ เพื่อเพิ่ม
ความเข้มข้นของสารสกัดก่อนทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งจะได้คอลลาเจนไฮโดรไลเซตผงที่ประกอบด้วย
เปปไทด์ขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 25 kDa ส่วนวิธีการสกัดที่ทำให้ได้คอลลาเจน type I ซึ่งประกอบด้วย
หน่วยย่อย $\beta\alpha_1$ และ α_2 คือ การสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนัก
เกล็ดปลาแห้งภายหลังการกำจัดแคลเซียม ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ($28\pm 2^\circ\text{C}$) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือ โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.9 M ซึ่ง
คอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดงและเกล็ดปลานิล มีอุณหภูมิการเสียสภาพอยู่ที่ 35.4°C และ
 37.4°C ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าสภาวะการสกัดคอลลาเจนมีความสำคัญต่อลักษณะสมบัติของคอลลาเจน
ที่สกัดได้ ดังนั้นจะต้องออกแบบกระบวนการให้สอดคล้องกับสมบัติของคอลลาเจนที่ต้องการนำไปใช้

Chalongkwan Pipatcharoenwong 2008: Fish Scale Collagen: Extraction and Partial Characterization. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Associate Professor Wunwiboon Garnjanagoonchorn, Ph.D. 116 pages.

The major composition of red snapper and Nile tilapia scales are protein and ash. In order to obtain high protein fish scale, decalcification process of fish scales was studied. The results showed that ash content of decalcified fish scales were less than 1% dry basis when decalcified by using 1.2 N HCl for 6 hours. In this study, decalcified fish scales were subjected to collagen extraction by 2 consecutive steps which were acid and heat process followed by acid combined with pepsin. Acetic acid was used in this study. The effects of ratio of scales:acid, pepsin concentration, temperature and time of both extraction steps were studied. These factors showed significant effects on molecular weight of peptide subunits and/or protein content of collagen extracted solution. The collagen extracted solution that has the highest protein content and composed of low molecular weight peptide subunits was obtained from acid and heat treatment at 90^oC for 9 hours and ratio of scales:acid was 1:5 (w/v) followed by acid combined with pepsin treatment at 37^oC for 72 hours using pepsin concentration at 2.5% (dry weight of decalcified fish scales). The collagen extracted solution was transferred into membrane filtration cartridge (MWCO = 3 kDa) and centrifuged at 2,400 x g for 30 mins. The collecting retentate was subjected to membrane filtration 3 times before spray drying to get collagen hydrolysate powder (CHP). CHP from red snapper and Nile tilapia scales composed of peptides with molecular weight lower than 25 kDa. If require type I collagen with β , α_1 and α_2 subunits, then fish scales should be extracted with acid combined with pepsin at room temperature (28 \pm 2^oC) for 72 hours where pepsin was added at 2.5% (dry weight of decalcified fish scales). Collagen was salted out from extracted solution by adding NaCl to give a final concentration of 0.9 M. The denaturation temperature of type I collagen from red snapper and Nile tilapia scales was 35.4^oC and 37.4^oC respectively. Therefore, the conditions of collagen extraction should be monitored in order to obtain collagen with specified characteristic.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ดิฉันขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณวิบูลย์ กาญจนบุญชู ประธานกรรมการ ที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการทำการวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณิ จิรภาคย์กุล กรรมการ ที่ปรึกษาวิชาเอก ดร.ศิริชัย ส่งเสริมพงษ์ ประธานการสอบ และ รองศาสตราจารย์ ดร.วางคณา สมพงษ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สงวนศรี เจริญเจริญ และคุณธัญญรัตน์ คำดี ที่ให้ความรู้วิธีการใช้และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่อง DSC

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ สกว. ที่มอบทุนสนับสนุนการทำวิจัยนี้ และขอขอบคุณ บริษัท บรรณวัชร ไปโอ-ไลน์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์แก่ผลิตภัณฑ์กระดาษสำหรับการทำงาน

สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดา มารดา ขอขอบคุณ พี่ น้อง ที่ช่วยให้คำปรึกษาในทุกๆเรื่องและให้กำลังใจตลอดมา ตลอดจน พี่ เพื่อน น้องๆ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ที่มีส่วนช่วยเหลือทุกอย่าง

ฉล่องขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์

มีนาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	37
อุปกรณ์	37
วิธีการ	40
ผลและวิจารณ์	50
สรุปและข้อเสนอแนะ	87
สรุป	87
ข้อเสนอแนะ	89
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	90
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	99
ภาคผนวก ข การใช้ไมโครมิเตอร์	104
ภาคผนวก ค วิธีการทำอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ SDS	108
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	116

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาชนิดต่างๆ	7
2	ชนิดของคอลลาเจน หน่วยย่อย และตำแหน่งที่พบ	16
3	ความเข้มข้นของเกลือที่ทำให้เกิดการตกตะกอนคอลลาเจนชนิดต่างๆ	21
4	องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา sea bream ก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียม (% w/w)	23
5	องค์ประกอบของกรดแอมิโน (residues/1000 total residues) และอุณหภูมิการเสียดสภาพ (Td) ของคอลลาเจนจากเกล็ดปลาต่างๆ เทียบกับหนังหมู (Porcine dermis)	27
6	องค์ประกอบทางเคมี (% น้ำหนักแห้ง) ของเกล็ดปลา	50
7	ลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสของเกล็ดปลาเริ่มต้นและเกล็ดปลาภายหลังการกำจัดแคลเซียม โดยการแช่กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ	54
8	ความหนาของเกล็ดปลา (มิลลิเมตร) หลังผ่านการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริก	55
9	องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ภายหลังการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ	57
10	pHของสารละลายภายหลังการกำจัดแคลเซียม และองค์ประกอบทางเคมี (% น้ำหนักแห้ง) ของเกล็ดปลากะพงแดงภายหลังการกำจัดแคลเซียมด้วยวิธีเดิมและวิธีใหม่	60
11	องค์ประกอบทางเคมี (% น้ำหนักแห้ง) ของเกล็ดปลากะพงแดงและเกล็ดปลานิลก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียม	61
12	ปริมาณโปรตีน (ต่อ 100 กรัม เกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัดคอลลาเจนที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อน และสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C และ 90°C เป็นเวลาต่างๆ	65

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ปริมาณกรัมของโปรตีน (ต่อ 100 กรัมเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาที่ผ่านการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:3 1:5 1:7 และ 1:9 (w/v) ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้น 0% 2.5% 5% และ 10% (w/w) ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	69
14	ปริมาณโปรตีน (ต่อ 100 กรัม เกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านและไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง จากนั้นสกัดต่อด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	73
15	ปริมาณของแข็งทั้งหมด (% Total solid) และค่า pH ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงก่อนและหลังการเพิ่มความเข้มข้นโดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรน ที่ความเร็ว 2,400 x g เป็นเวลาและจำนวนรอบต่างๆ	77
16	ปริมาณโปรตีน (ต่อ 100 กรัม เกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัดคอลลาเจนก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย และปริมาณผลได้ (% yield) ภายหลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย	80
17	ปริมาณโปรตีน (ต่อ 100 กรัม เกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัดคอลลาเจนก่อนการตกตะกอนแยกคอลลาเจน type I และปริมาณผลได้ (% yield) ภายหลังจากการทำแห้งแบบระเหิด	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก1	ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณองค์ประกอบทางเคมี (% น้ำหนักแห้ง) ของเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและเวลาในการแช่ต่างๆกัน	100
ก2	ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบความหนา (มิลลิเมตร) ของเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและเวลาในการแช่ต่างๆกัน	101
ก3	ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆกัน	101
ก4	ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่สกัดโดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดและความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซินต่างๆ	102
ก5	ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆกัน	102
ก6	ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมงตามด้วยการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆกัน	103
ก7	ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณของแข็งทั้งหมดในสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านการเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีต่างๆ	103
ค1	สูตรสำหรับการเตรียม SDS-PAGE Separating and Stacking Gel	110

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เกล็ดปลาชนิดต่างๆ ซึ่งแบ่งตามลักษณะโครงสร้าง	6
2	ตัวอย่างเกล็ดปลาของปลาบางชนิด	6
3	Tensile stress-strain curve ของเกล็ดปลา <i>P. major</i> ($n = 10$) เส้นกราฟบริเวณที่วงกลมแสดงถึงคุณสมบัติความเป็นพลาสติกของเกล็ดปลาก่อนการฉีกขาดอย่างถาวร	8
4	ภาพจากกล้อง SEM ของเกล็ดปลาที่แตกหัก แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างคอลลาเจนและโครงสร้างที่ถูกดึงออกเป็นเส้นใยคอลลาเจน	9
5	โครงสร้างของคอลลาเจน	12
6	โครงสร้างซ้อนทับของเส้นใยคอลลาเจนที่มีผลต่อรูปแบบของแถบ (banding pattern) ของเส้นใยคอลลาเจนที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน	13
7	ลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนในเอ็น พังศิ๊ด และหนัง	14
8	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (โพรลีน + ไฮดรอกซีโพรลีน) ของคอลลาเจนต่างๆ จากตัวอย่างต่างๆ และ molecular melting temperatures (T_m) ของคอลลาเจนเหล่านี้	15
9	ขั้นตอนการแยกคอลลาเจน type I, III, IV และ V ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเนื้อสัตว์	20
10	องค์ประกอบทางเคมีของกระดูกปลาก่อน (ทางซ้าย) และหลัง (ทางขวา) ผ่านการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดคอลลาเจน	24
11	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis ของคอลลาเจน type I จากหนังหมูและเกล็ดปลาบน 3.5% gels ที่มี 3.5 M urea โดยที่ (a) หนังหมู, (b) เกล็ดปลา sardine, (c) เกล็ดปลา red sea bream และ (d) เกล็ดปลา Japanese sea bass	26
12	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิการเสียสภาพกับปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนและปริมาณโพรลีน	28

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา	43
14	กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ขณะทำการแช่เกล็ดปลากะพงแดงในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นต่างๆ นาน 6 ชั่วโมง	51
15	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเถ้าของเกล็ดปลากะพงแดงภายหลังการแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นต่างๆ นาน 6 ชั่วโมง	53
16	ขั้นตอนการกำจัดแคลเซียมด้วย “วิธีใหม่”	59
17	ลักษณะบน 16.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 75 ^o C (a) และ 90 ^o C (b) เป็นเวลา 1-12 ชั่วโมง (lane 1-12) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 ^o C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารสกัดคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน โดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน (lane E) และ standard marker proteins (lane M)	63
18	ลักษณะบน 7.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน (lane E) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) และความเข้มข้นเอนไซม์เปปซินเป็น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 ^o C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M) และ คอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว (lane I)	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะบน 16.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ที่อัตราส่วนระหว่างเกล็ดปลาต่อกรดอะซิติกเป็น 1:3 1:5 1:7 และ 1:9 (w/v) (lane 1:3 1:5 1:7 และ 1:9) และสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 0% (a) 2.5% (b) 5% (c) และ 10% (d) ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M)	67
20	ลักษณะบน 16.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) และสกัดต่อในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) (a) และอุณหภูมิ 37°C (b) เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (lane 24 48 และ 72) เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M)	71
21	ลักษณะบน 7.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน สกัดเฉพาะขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ที่อุณหภูมิ 4°C (a) และอุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) (b) เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (lane 24 48 และ 72) เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M) และคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว (lane I)	72
22	สารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงเริ่มต้น (collagen extracted solution), สารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านการทำให้เข้มข้นโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,400 x g เป็นเวลา 60 นาทีต่อรอบ (a) และ 30 นาทีต่อรอบ (b) จำนวน 1–3 รอบ และ permeate จากการหมุนเหวี่ยงสารสกัดคอลลาเจน	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	สารสกัดคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลากะพงแดง (a) และสารสกัดคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลานิล (b) ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย	78
24	ลักษณะบน 16.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง (a) ก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย (lane R1 และ R2) และสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิล (b) ก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย (lane N1 และ N2) เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M)	79
25	DSC thermogram ของสารละลายคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลากะพงแดง (a) และคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลานิล (b)	82
26	คอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดงและคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล	83
27	ลักษณะบน 7.5% SDS-PAGE ของคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดง (lane R) และคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล (lane N) เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M) และคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว (lane I)	84
28	DSC thermogram ของสารละลายคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดง (a) และคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล (b)	86
ภาพผนวกที่		
ข1	ส่วนประกอบของไมโครมิเตอร์	105
ข2	ตัวอย่างสเกลบนไมโครมิเตอร์ที่วัดได้	106
ข3	ตัวอย่างไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน	107
ข4	ตัวอย่างไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพไม่พร้อมใช้งาน	107

คอลลาเจนจากเกล็ดปลา: การสกัดและคุณสมบัติบางประการ

Fish Scale Collagen: Extraction and Partial Characterization

คำนำ

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบในปริมาณสูงที่สุดประมาณ 30% ของโปรตีนในร่างกายสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร ใช้ในทางการแพทย์และทางเภสัชกรรม ใช้เป็นแคปซูลยา ใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิว และในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง (Swan and Torley, 1991) ซึ่งแหล่งคอลลาเจนที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่สำคัญ คือ กระดูกและหนังของวัวและสุกร แต่จากรายงานการติดเชื้อวัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy: BSE) (Nagai *et al.*, 2004) และสุกรไม่สามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารในกลุ่มคนบางศาสนา (Sadowska *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงมีการแสวงหาแหล่งวัตถุดิบใหม่นอกเหนือจากวัวและสุกร

เกล็ดปลาเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมปลาแช่เย็นและแช่เยือกแข็ง ซึ่งประกอบด้วย extracellular matrix ที่มีคอลลาเจน type I จัดเรียงตัวกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติ และมี calcium-deficient hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ประกอบอยู่ในโครงสร้าง (Ikoma *et al.*, 2003 a) ซึ่งจากการทดลองของ Nagai *et al.* (2004) ได้สกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา sardine, red sea bream, และ Japanese sea bass ได้ปริมาณคอลลาเจนจากปลาแต่ละชนิดมีปริมาณสูงมาก โดยมีค่าเท่ากับ 50.9% 37.5% และ 41.0% (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ดังนั้นเกล็ดปลาจึงสามารถใช้เป็นแหล่งของคอลลาเจนได้ แต่จากการศึกษาวิธีการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาโดยนักวิจัยกลุ่มต่างๆ (Kimura *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1996; Ikoma *et al.*, 2003 b; Nagai *et al.*, 2004) พบว่า วิธีการสกัดมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ใช้เวลานาน ใช้สารเคมีหลายชนิดในกระบวนการ นอกจากนี้บางวิธียังให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ต่ำ

ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่มีอิทธิพลต่อการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา และศึกษาสมบัติบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้ เพื่อเป็นแนวทางการเพิ่มมูลค่าให้กับเกล็ดปลาที่เป็นส่วนเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมปลาแช่เย็นและแช่เยือกแข็ง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากเกล็ดปลากะพงแดง
2. ศึกษาผลของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัดคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดง
3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตและคอลลาเจน type I ที่สกัดได้จากเกล็ดปลากะพงแดง
4. ศึกษาผลของการใช้สภาวะการสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซตและคอลลาเจน type I กับเกล็ดปลาอื่น ซึ่งในการทดลองเลือกใช้เกล็ดปลานิล

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของปลากะพงแดงและปลานิล

1.1 ปลากะพงแดง

ปลากะพงแดง (red snapper, mangrove jack) เป็นปลาน้ำเค็มชนิดหนึ่งที่สามารถอาศัยอยู่ในน้ำกร่อยหรือน้ำจืดได้ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lutjanus argentimaculatus* อยู่ในวงศ์ปลากะพงแดง (Lutjanidae) รูปร่างลำตัวหนาและด้านข้างแบน หัวโตแหลมยาว ลักษณะโดยทั่วไปคล้ายปลากะพงขาวแต่มีส่วนหัวและลำตัวที่ยาวกว่า มีฟันเขี้ยวแหลมคม ใจังเห็นชัดเจน 2 ซี่ในปาก คอดหางมีขนาดใหญ่และแข็งแรง เกล็ดใหญ่มีขอบหยักเป็นหนามเมื่อลูบจะสากมือ (Ctenoid) ครีบหลังอันแรกมีก้านครีบเป็นหนามแข็ง ปลายแหลม อันที่สองเป็นครีบอ่อนมีขนาดใกล้เคียงกัน ครีบใหญ่ปลายมนกลม พื้นลำตัวสีแดงหรือแดงสด ขนาดของปลาที่พบใหญ่สุดถึง 1.5 เมตร นิยมอยู่รวมกันเป็นฝูงในป่าชายเลน ปากแม่น้ำ หรือบริเวณทะเลชายฝั่ง

กะพงแดงเป็นปลาที่สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้ ธรรมชาติ นิยมบริโภค เป็นปลาเศรษฐกิจ และนิยมตกเป็นเกมกีฬา อีกทั้งยังเลี้ยงเป็นปลาสวยงามได้อีกด้วย กะพงแดง ยังมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป ได้แก่ กะพงสีเลือด หรือ กะพงแดงป่าชายเลน เป็นต้น (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2550 ก)

1.2 ปลานิล

ปลานิล (Nile tilapia) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง ในวงศ์ปลาหมอสี (Cichlidae) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (ชื่อเดิมคือ *Tilapia nilotica*) ปลานิลสามารถอาศัยอยู่ได้ในน้ำจืดและน้ำกร่อย มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบ ในประเทศ 수단 ยูกันดา แทนแกนยิกา ปลานิลเข้าสู่ประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระจักรพรรดิอะกิฮิโตะ เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ซึ่งทรงจัดส่งเข้ามาทูลเกล้าถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508

ปลานิล เป็นปลาเศรษฐกิจ แพร่ขยายพันธุ์ง่าย และมีรสชาติดี รูปร่างคล้ายปลาหมอเทศ แตกต่างกันว่าปลานิลมีลายสีดำและจุดสีขาวสลับกันไป บริเวณครีบหลัง ครีบกันและลำตัวมีสีเขียว

บนน้ำตาด มีลายดำพาดขวางตามลำตัว มีความยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2550 ข)

2. เกล็ดปลา

ร่างกายของสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิดปกคลุมด้วยเกล็ด เกล็ดมีต้นกำเนิดมาจาก 2 แหล่งใหญ่ คือ ผิวหนังชั้นนอกและผิวหนังชั้นใน เกล็ดในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น เกล็ดงู มีต้นกำเนิดมาจากผิวหนังชั้นนอก เรียกเกล็ดชนิดนี้ว่า epidermal scale สำหรับเกล็ดปลาเรียกว่า dermal scale มีต้นกำเนิดจากผิวหนังชั้นใน เนื่องจากเป็นส่วนที่ยื่นออกมาภายนอกร่างกายและห่อหุ้มตัวปลา จึงอาจถือว่าเป็นโครงกระดูกภายนอก (exoskeleton) บางครั้งเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า integumentary skeleton ปลาบางชนิดไม่มีเกล็ด เช่น ปลาดุก ปลากระเบนไฟฟ้า ปลาบางชนิดมีเกล็ดขนาดเล็กมากและฝังแน่นในผิวหนัง เช่น ปลาไหล ปลาบางชนิดมีเกล็ดตามตัวเป็นหย่อมๆ หรือบางชนิดมีเพียง 2-3 แถวเท่านั้น เกล็ดของปลาบางชนิดแผ่เป็นแผ่นบางห่อหุ้มรอบตัว เกล็ดปลาบางชนิดยึดติดแน่นกับผิวหนังและบางชนิดหลุดง่าย (วิมล, 2540)

2.1 ชนิดของเกล็ดปลา

เกล็ดปลามีโครงสร้างและส่วนประกอบแตกต่างกันไป อาจแบ่งเกล็ดออกตามลักษณะโครงสร้างได้ 2 ชนิดใหญ่ๆ (วิมล, 2540; อัมพร, 2545) ดังนี้

2.1.1 เกล็ดปลาพลาโคอยด์ (placoid scale)

พบในกลุ่มปลากระดูกอ่อน ได้แก่ ปลาฉลามและปลากระเบน เกล็ดพลาโคอยด์มีขนาดเท่าเดิม แม้ว่าปลาจะตัวโตขึ้น เกล็ดนี้จะปกคลุมตลอดทั้งตัวรวมถึงส่วนของกรีบด้วย โดยจะมีการหลุดแต่สามารถสร้างขึ้นมาทดแทนได้ รูปร่างของเกล็ดอาจจะแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด เช่น เป็นปุ่ม เป็นแผ่น การเรียงตัวของเกล็ดไม่เป็นแบบแผ่นต่อแผ่น แต่จะเหลื่อมกันไปเรื่อยๆ ยกเว้นบริเวณเส้นข้างตัว (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2)

2.1.2 เกล็ดน็อนพลาโคยด์ (non-placoid scale) แบ่งออกเป็น

ก. เกล็ดคอสมอยด์ (cosmoid scale)

พบในซากดึกดำบรรพ์ของปลาหมึกและปลาซีลาแคนซ์ เป็นเกล็ดที่มีความแข็งแรงมากกว่าเกล็ดพลาโคยด์ เกล็ดคอสมอยด์มีการเจริญเฉพาะขอบที่อยู่ใต้ผิวหนังเท่านั้น ส่วนที่โผล่ออกมาข้างนอกจะไม่เจริญ รูปร่างของเกล็ดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน (rhomboid) หรือกลม (cycloid) ปัจจุบันพบเฉพาะในปลาซีลาแคนซ์เท่านั้น ส่วนปลาหมึกได้มีวิวัฒนาการของเกล็ดเป็นแบบของปลาชั้นสูงไปแล้ว (ภาพที่ 2)

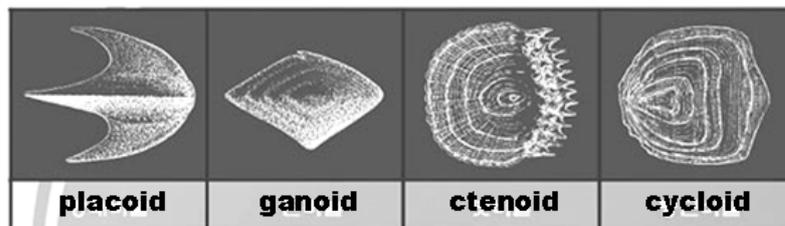
ข. เกล็ดกานอยด์ (ganoid scale)

เกล็ดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูนหนาๆ มีหนามแหลมโผล่ขึ้นมาข้างบน เข้าใจว่ามีวิวัฒนาการมาจากเกล็ดคอสมอยด์ แยกออกได้เป็น 2 แบบ คือ เกล็ดพาลีโอนิสคอยด์ (palaeoniscoid scale) และเกล็ดเลปิโดสโตรอยด์ (lepidostroid scale) เกล็ดกานอยด์มีการเจริญได้ทุกส่วน รวมทั้งด้านที่โผล่ขึ้นมาออกผิวหนัง ปัจจุบันพบในปลาหริด ปลาการ์ ปลาสเตอร์เจียน และปลาแพคเคิล (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2)

ค. เกล็ดอีลาสมอยด์ (elasmoid scale) หรือ โบนี-ริดจ์ (bony-ridge scale)

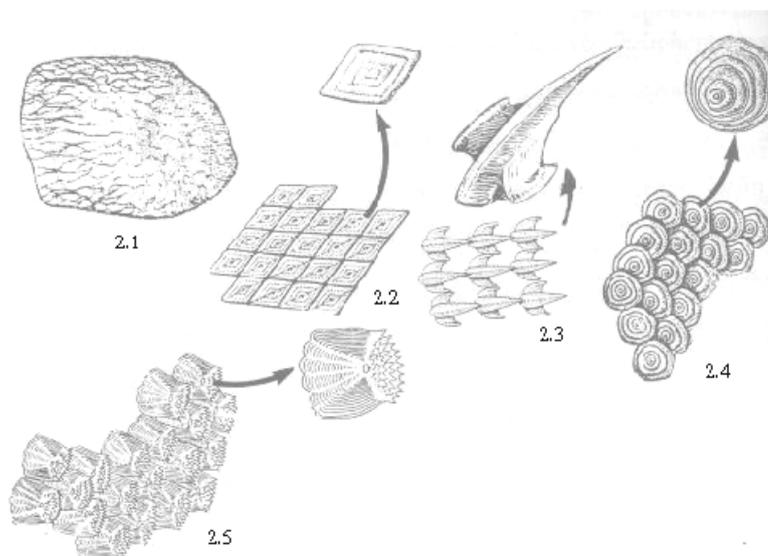
เกล็ดอีลาสมอยด์เป็นเกล็ดของปลากระดูกแข็งชั้นสูง มีวิวัฒนาการมาจากเกล็ดเลปิโดสโตรอยด์ เกล็ดมีลักษณะบางใสและหักงอได้ เกล็ดมีการเจริญเติบโตได้ทุกส่วน แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เกล็ดขอบเรียบ (cycloid scale) มีลักษณะของขอบเกล็ดเรียบ เวลาลูบจากทางหางไปยังหัวจะรู้สึกสากมือ (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2) และเกล็ดของหัยก (ctenoid scale) มีลักษณะของขอบเกล็ดเป็นหนามแหลม ขรุขระ เวลาลูบจากหางไปยังหัวจะรู้สึกสากมือ (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2) เกล็ดอีลาสมอยด์เรียงเป็นแบบล้อมซ้อนกัน ส่วนหน้าของเกล็ดฝังอยู่ในผิวหนัง เกล็ดเหล่านี้มีสวดลายแตกต่างกัน ขึ้นกับอัตราการเติบโตของปลา การเจริญของเกล็ดเริ่มจากจุดศูนย์กลางรวม (focus) แล้วเจริญออกไปเป็นวงๆ เรียกว่า วงของเกล็ด (circular) วงเหล่านี้มีความกว้างไม่เท่ากัน ถัดจากวงของเกล็ดหลายๆวง จะมีวงหนึ่งซึ่งมีสีเข้ม ชัดเจนกว่าวงอื่นๆ เรียกว่า วงปี (annulus) ซึ่งใช้คำนวณอายุและอัตราการเติบโตของปลาได้ เนื่องจากวงเหล่านี้จะขยายมากหรือน้อยขึ้นกับอาหารการกินของปลาในแต่ละฤดูกาล

ปลาที่มีเกล็ดขอบเรียบ ส่วนใหญ่เป็นปลาที่มีวิวัฒนาการต่ำและเกล็ดหลุดง่าย เช่น ปลาหลังเขียว ปลากะตัก และปลาตะเพียน ปลาที่มีเกล็ดขอบหยัก ส่วนใหญ่เกล็ดจะติดแน่นกับลำตัว เป็นปลาที่มีวิวัฒนาการสูง มีก้านครีบแข็ง และเกล็ดอาจมีขนาดไม่เท่ากันตลอดลำตัว เช่น ปลาจวด ปลาหมอ และปลาสาก เป็นต้น



ภาพที่ 1 เกล็ดปลาชนิดต่างๆ ซึ่งแบ่งตามลักษณะโครงสร้าง

ที่มา: Anonymous (n.d.)



ภาพที่ 2 ตัวอย่างเกล็ดปลาของปลาบางชนิด

- 2.1 เกล็ดคอสมอยด์ของปลาหมี่ปอด
- 2.2 เกล็ดกานอยด์ของปลาการ์
- 2.3 เกล็ดพลาโคอยด์ของปลาจวด
- 2.4 เกล็ดไซคลอยด์ของปลาโรว์ฟินและปลากระดุกแข็งทั่วไป
- 2.5 เกล็ดทีนอยด์ของปลาหมอและปลากระดุกแข็ง

ที่มา: สุภาพร (2542)

2.2 คุณสมบัติของเกล็ดปลา

จากรายงานของประเสริฐ (2524) ได้กล่าวถึงองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาชนิดต่างๆ ไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าเกล็ดปลาที่มีสารประกอบไนโตรเจนอยู่ค่อนข้างสูงประมาณ 25–35% แต่อยู่ในรูปของโปรคอลลาเจน และมีโปรตีน Ichthlipidin ซึ่งมีลักษณะต่างจากโปรคอลลาเจน คือ ละลายได้ในน้ำร้อน

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาชนิดต่างๆ

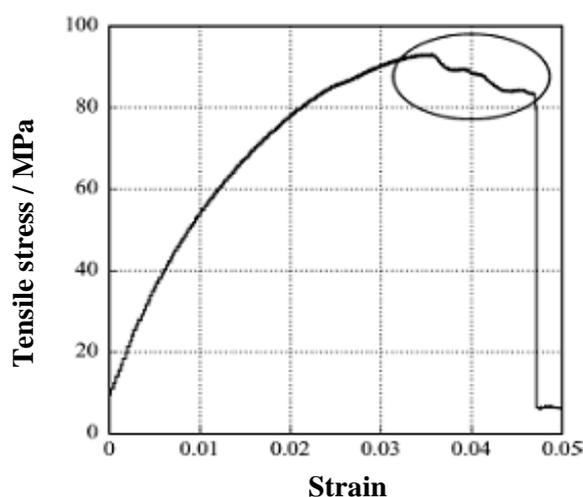
ชนิดของปลา	ปริมาณ (%)				
	น้ำ	ไขมัน	สารไนโตรเจน (N x 6.25)	เกลือแร่	ฟอสฟอรัส
Herring	51.5 – 56.0	0.5 – 1.0	26.5 – 28.5	16.5 – 18.5	0.5 – 0.6
Sardine	32.5 – 38.5	0.5 – 1.5	29.5 – 36.5	29.0 – 32.0	-
Pike-perch	51.5 – 57.5	0.1 – 0.8	19.5 – 26.5	19.5 – 23.5	4.5 – 8.0
Barb	51.0 – 54.5	0.4 – 0.5	32.0 – 34.0	14.0 – 15.5	1.2 – 2.1
Bream	54.5 – 60.5	0.1 – 0.5	25.0 – 31.0	14.0 – 15.0	1.0 – 2.0
Pike	55.5 – 57.5	0.1	24.5 – 26.5	17.0	2.3 – 3.2

ที่มา: ประเสริฐ (2524)

นอกจากนี้ Fahmi *et al.* (2004) ได้รายงานถึงองค์ประกอบทางเคมีโดยน้ำหนักแห้งของเกล็ด sea bream พบว่าประกอบด้วย โปรตีน 51.2% ไขมัน 0.1% สารอินทรีย์อื่นๆ 1.4% และสารอนินทรีย์ 47.3% และจากรายงานของ Nagai *et al.* (2004) ยังแสดงข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบของเกล็ดปลาทั่วไปว่าประกอบด้วย ความชื้น 70% โปรตีน 27% ไขมัน 1% และเถ้า 2% โดยโปรตีนในเกล็ดปลาส่วนใหญ่ คือ คอลลาเจน

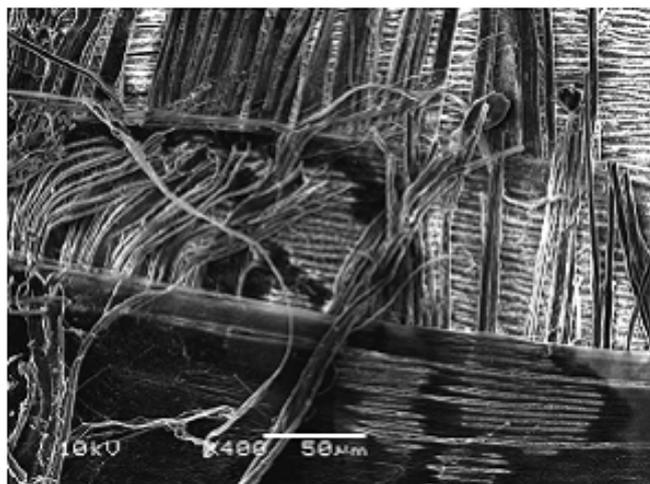
จากการศึกษาของ Ikoma *et al.* (2003 a) เกี่ยวกับโครงสร้างของเกล็ดปลา *Pagrus major* พบว่าประกอบด้วย extracellular matrix ที่มีคอลลาเจน type I จัดเรียงตัวกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติ และมี calcium-deficient hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ประกอบอยู่ในโครงสร้าง และได้ศึกษาค่า tensile strength (ค่า stress ที่จุดแตกหัก) ของเกล็ดปลา *Pagrus major* ซึ่งมีค่าเฉลี่ย

ประมาณ 93 ± 1.8 MPa ($n = 10$) จาก tensile stress–strain curve (ภาพที่ 3) ในช่วงแรกของกราฟ ความสัมพันธ์จะเป็นเส้นตรง ทำให้ทราบค่า Young’s modulus (stress/strain) เป็น 2.2 ± 0.3 GPa ซึ่งค่านี้แสดงถึงความแข็ง (stiffness) ที่ต่ำ เนื่องจากเกล็ดปลาที่มีปริมาณแร่ธาตุต่ำ (46%) เมื่อเปรียบเทียบกับ red deer (~50%, 6.1 GPa) และ axis deer (~80%, 31.6 GPa) จะเห็นว่าปริมาณแร่ธาตุและค่า Young’s modulus มีความสัมพันธ์กัน ซึ่ง Currey and Brear (1990) และ Mann (2001) ได้อธิบายถึงลักษณะ tensile stress–strain curve ที่แสดงถึงคุณสมบัติความเป็นพลาสติก (plastic yielding) ซึ่งมีลักษณะดังภาพที่ 3 คือ ที่ค่า stress สูง เกล็ดปลาจะสามารถรับแรงต่อไปได้อีกระยะหนึ่งก่อนที่จะเกิดการฉีกขาดอย่างถาวร ลักษณะดังกล่าวแสดงถึงคุณสมบัติความเป็นพลาสติกของเกล็ดปลา ซึ่งจากภาพเกล็ดปลาที่ได้จากกล้อง SEM (ภาพที่ 4) พบว่าเกล็ดปลาประกอบด้วยโครงสร้างคอลลาเจนที่เป็นเส้นใย เมื่อเกิดการฉีกขาด โครงสร้างคอลลาเจนจะแยกออกเป็นเส้นใย (ความหนาประมาณ 2–3 μm) ทำให้สามารถรับแรงต่อไปได้อีกระยะหนึ่งก่อนการฉีกขาดอย่างถาวร ส่งผลให้เกิดคุณสมบัติความเป็นพลาสติก ณ จุด yield point (จุดที่มีค่า strain สูงสุด ก่อนการเปลี่ยนสภาพจาก elastic เป็น plastic) ส่วนเกล็ดปลาที่กำจัดแคลเซียมออกนั้นจะมีค่า tensile strength และ Young’s modulus ลดลงเหลือ 36 ± 8.4 MPa และ 0.53 ± 0.06 GPa ($n = 10$) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พฤติกรรมการแตกหักยังคงเหมือนกับเกล็ดปลาที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดแคลเซียม นั่นคือ ยังคงแสดงคุณสมบัติความเป็นพลาสติก



ภาพที่ 3 Tensile stress–strain curve ของเกล็ดปลา *P. major* ($n = 10$) เส้นกราฟบริเวณที่วงกลม แสดงถึงคุณสมบัติความเป็นพลาสติกของเกล็ดปลาก่อนการฉีกขาดอย่างถาวร

ที่มา: Ikoma *et al.* (2003 a)



ภาพที่ 4 ภาพจากกล้อง SEM ของเกล็ดปลาที่แตกหัก แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างคอลลาเจน และโครงสร้างที่ถูกดึงออกเป็นเส้นใยคอลลาเจน
ที่มา: Ikoma *et al.* (2003 a)

ในปัจจุบันมีการนำเกล็ดปลาไปใช้ประโยชน์มากมาย เช่น นำมาทำเป็นดอกไม้ประดิษฐ์ (นิรนาม, ม.ป.ป.) เครื่องประดับประเภทโบว์ติดผม เข็มกลัดติดเสื้อ ต่างหู เป็นต้น หรือใช้ตกแต่งของใช้ เช่น กรอบรูป กระຈก กล่องใส่นามบัตร แจกัน เป็นต้น (จงจิตร, ม.ป.ป.) การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการใช้ประโยชน์ โดยที่คอลลาเจนที่สกัดได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร ใช้ในทางการแพทย์และทางเภสัชกรรม ใช้เป็นแคปซูลยา ใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิวและในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง (Swan and Torley, 1991) ซึ่งทำให้เกิดมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น จากสถิติปริมาณการส่งออกสินค้าประมงของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2540–2543 พบว่า ในแต่ละปีประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์จากปลาแช่เย็นและปลาแช่เยือกแข็งจำนวนมาก และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง กล่าวคือ ในปี พ.ศ. 2540 มีปริมาณ 98,417 เมตริกตัน และเพิ่มเป็น 122,809 เมตริกตัน ในปี พ.ศ. 2543 (มัทนา, 2545) ซึ่งทำให้สามารถคาดคะเนถึงปริมาณเกล็ดปลาที่เป็นของเหลือทิ้งจากผลิตภัณฑ์ปลาได้ว่ามีจำนวนมากเช่นกัน ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะนำเกล็ดปลา ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งเหล่านี้ไปเพิ่มมูลค่า โดยการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา

3. เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด และสารประกอบเชิงซ้อน โพลีแซคคาไรด์ ซึ่งโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ คอลลาเจน อีลาสติน และเรติคิวลิน โดยที่โปรตีนส่วนใหญ่ที่พบ คือ คอลลาเจน ส่วนสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน ได้แก่ อีลาสติน โปรติโอไกลแคน และโพลีแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ ซึ่งโปรติโอไกลแคนและโพลีแซคคาไรด์ขนาดใหญ่นี้จะอยู่รวมกับน้ำ เกิดเป็นสารที่เรียกว่า ground substance เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่แตกต่างกัน จะมีปริมาณของคอลลาเจนและสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนที่แตกต่างกัน แต่ส่วนใหญ่จะพบสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนอยู่ในปริมาณน้อย ตัวอย่างเช่น เอ็น จะมีปริมาณคอลลาเจนอยู่ประมาณ 95% (น้ำหนักแห้ง) ส่วนอีลาสตินจะมีอยู่เพียงเล็กน้อยประมาณ 1% (น้ำหนักแห้ง) (Bailey and Light, 1989)

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในสัตว์ชั้นสูงสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ skeletal tissues และ soft connective tissue โดยที่ skeletal tissues จะประกอบด้วย เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง (mineralized connective tissue) เช่น กระดูก ฟัน และกระดูกอ่อน ส่วน soft connective tissue เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบน้อย เช่น หนัง เอ็น (tendons: เอ็นที่ยึดระหว่างกล้ามเนื้อกับกระดูก) ฟังซีด (ligaments: เอ็นที่ยึดระหว่างกระดูกกับกระดูก) หลอดเลือด และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งอวัยวะภายในและภายนอก (Bailey and Light, 1989)

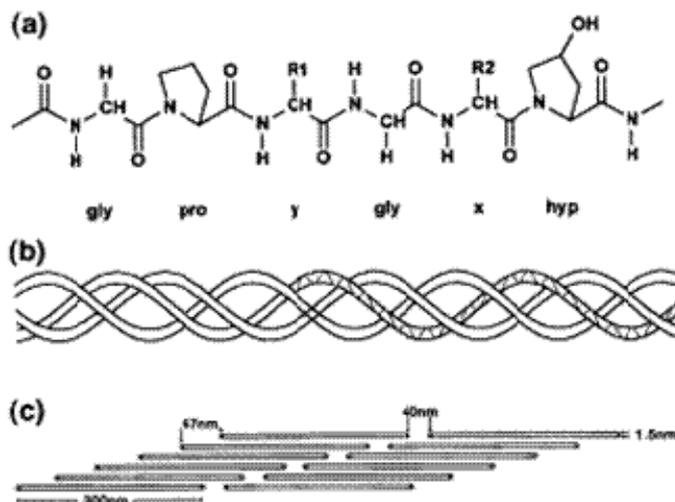
4. คอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบมากในร่างกายของสัตว์ที่มีและไม่ มีกระดูกสันหลัง ซึ่งมีประมาณ 30% ของโปรตีนทั้งหมด โดยจะพบมากในผิวหนัง เอ็น กระดูก และกระดูกอ่อน โดยที่ปริมาณคอลลาเจนจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อและอายุของสัตว์ (Balian and Bowes, 1977; Bailey and Light, 1989; Poppe, 1992) ส่วนลักษณะของคอลลาเจน โดยทั่วไปคล้ายคลึงกันจะต่างกันเพียงเล็กน้อยในองค์ประกอบของกรดแอมิโน ซึ่งทำให้คุณสมบัติ โดยทั่วไปของคอลลาเจนต่างกันไป ปัจจัยสำคัญที่พบว่ามีอิทธิพล คือ สายพันธุ์และชนิดของเนื้อเยื่อ (มาลัยวรรณ และ วรรณวิบูลย์, 2549)

4.1 โครงสร้างของคอลลาเจน

คอลลาเจนมอนอเมอร์เป็นโปรตีนทรงกระบอก ยาว (long cylindrical protein) มีความยาวประมาณ 2800 \AA และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ $14-15 \text{ \AA}$ ซึ่งประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 3 สาย ซึ่งแต่ละสายเรียกว่า สายแอลฟา (α -chain) และแต่ละสายจะมีกรดอะมิโนมากกว่า 1000 ตัวต่อกัน โดยทั่วไปจะประกอบด้วย กรดอะมิโนชนิดไกลซีน (Glycine: Gly) ประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมดในโมเลกุลคอลลาเจน และมีกรดอิมิโน (imino acid) ประมาณ 1 ใน 4 โดยแยกเป็นโพรลีน 12% และไฮดรอกซีโพรลีน 11% (Ward and Courts, 1977) ซึ่งลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนจะมีลักษณะซ้ำๆกันของ -Gly-X-Y- โดย X และ Y มักเป็นโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนตามลำดับ ดังภาพที่ 5 (a) แต่ก็สามารถเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นได้เช่นกัน ยกเว้น ทริปโตเฟน (Tryptophan) การสังเคราะห์ไฮดรอกซีโพรลีนในคอลลาเจนเกิดขึ้นหลังจากการสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์แล้ว โดยโพรลีนจะเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) ซึ่งเร่งโดยเอนไซม์โพรลีนไฮดรอกซีเลส (proline hydroxylase) เกิดเป็นไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งต้องการกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) สำหรับการทำงานของเอนไซม์ การขาดวิตามินซีทำให้คอลลาเจนสร้างเส้นใยที่ไม่สมบูรณ์ เช่น ทำให้เกิดโรคคลักปิดลักเปิด (scurvy) (Foegeding *et al.*, 1996; Friess, 1998; มาลัยวรรณ และ วรรณวิบูลย์, 2549)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สำคัญ 2 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในคอลลาเจน ซึ่งจะเปลี่ยนโพรลีนเป็นไฮดรอกซีโพรลีน และเปลี่ยนไลซีนเป็นไฮดรอกซีไลซีน ซึ่งปฏิกิริยานี้จะถูกรเร่งโดยเอนไซม์โพรลีนไฮดรอกซีเลส (proline hydroxylase) และ ไลซีนไฮดรอกซีเลส (lysine hydroxylase) ตามลำดับ ระบบเอนไซม์ดังกล่าวมีการใช้ oxygen, α -ketoglutarate, ferrous ion, และ reducing substance เช่น ascorbate และถ้าปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้มีตัวเร่งเป็นเอนไซม์ lysyl oxidase (copper containing enzyme) จะมีการเปลี่ยนแปลงได้เป็น 1-amino-1-carboxy-pentan-5-al ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะเชื่อมข้ามของคอลลาเจน (Foegeding *et al.*, 1996)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของคอลลาเจน

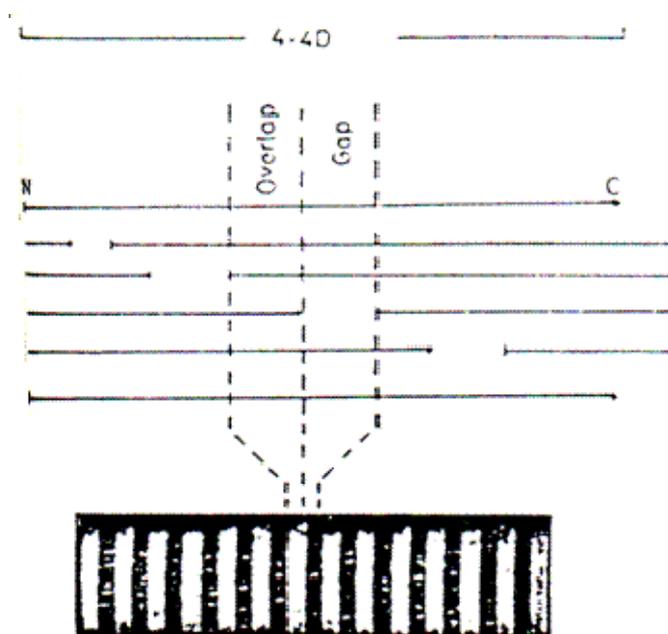
- (a) ลำดับของกรดแอมิโน
- (b) โครงสร้างของโทรโปคอลลาเจน
- (c) การจัดเรียงตัวของโทรโปคอลลาเจนเป็นเส้นใยคอลลาเจน

ที่มา: Friess (1998)

แต่ละสายของโพลีเปปไทด์จะวนเป็นเกลียวไปทางซ้าย (left-hand helix) โดยมีพันธะไฮโดรเจน ซึ่งแต่ละรอบมี 3.3 residues และมีระยะห่างระหว่างเกลียวเท่ากับ 0.87 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 5 (a) จากนั้นสายโพลีเปปไทด์ทั้ง 3 สายจะพันรอบกันเองเป็นเกลียววนขวา (right-hand helix) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายโพลีเปปไทด์แต่ละสาย ซึ่งเรียกสายเปปไทด์ที่บิดรวมกัน 3 สายนี้ว่า โทรโปคอลลาเจน (tropocollagen) ซึ่งมีระยะห่างระหว่างเกลียวประมาณ 8.6 นาโนเมตร น้ำหนักโมเลกุลของโทรโปคอลลาเจนจะประมาณ 300 kDa ความยาว 300 นาโนเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 นาโนเมตร ดังภาพที่ 5 (b) นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว เรียกบริเวณนี้ว่า ทีโลเปปไทด์โซน (telopeptide zone) โทรโปคอลลาเจนจะเรียงตัวขนานกันโดยมีแรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander Waals force) และไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) เชื่อมระหว่างโทรโปคอลลาเจนทำให้เกิดลักษณะเป็นเส้นใยของคอลลาเจน ดังภาพที่ 5 (c)

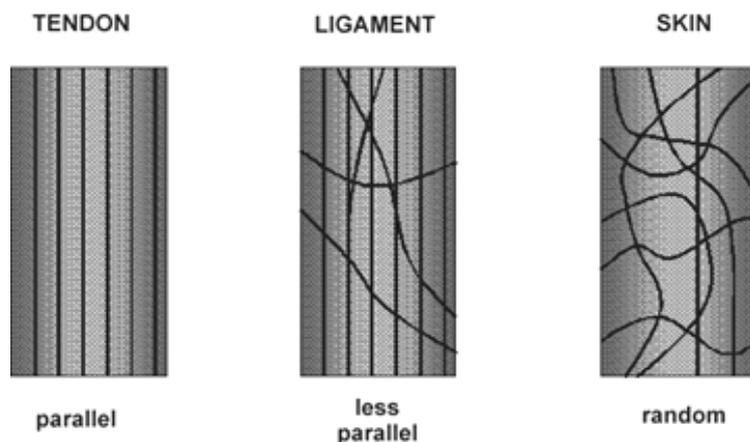
โพลีเปปไทด์ของคอลลาเจนส่วนใหญ่เป็นฮิสิกซ์ ยกเว้นที่ปลายแต่ละด้านของฮิสิกซ์จะมีความแตกต่างจากโครงสร้างแอลฟาฮิสิกซ์ (α -helical structure) เนื่องจากคอลลาเจนอุดมไปด้วยไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline: Hyp) และโพรลีน (Proline: Pro) ซึ่งเป็นตัวที่เข้าไปสอดแทรกใน

โครงสร้างแอลฟาอีลิกซ์ โมเลกุลของคอลลาเจนจะเชื่อมต่อกันแบบหัวต่อหาง (end to end) และสร้างเป็นเส้นใยคอลลาเจน ดังแสดงในภาพที่ 6 เส้นใยคอลลาเจนบางที่ก็จัดเรียงตัวแบบขนานกัน เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้มากขึ้น เช่น ในเอ็น หรืออาจมีกิ่งมากและจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เช่น ในหนัง ดังภาพที่ 7 และจากการที่คอลลาเจนเป็น โปรตีนชนิดเดียวที่อุดมไปด้วยไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งมีมากถึงประมาณ 10% ของคอลลาเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และไฮดรอกซีโพรลีนเองจะพบในโปรตีนชนิดอื่นๆปริมาณน้อย ดังนั้น ไฮดรอกซีโพรลีนจึงมักเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างอาหาร (Foegeding *et al.*, 1996)



ภาพที่ 6 โครงสร้างซอนทักของเส้นใยคอลลาเจนที่มีผลต่อรูปแบบของแถบ (banding pattern) ของเส้นใยคอลลาเจนที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

ที่มา: Foegeding *et al.* (1996)



ภาพที่ 7 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนในเอ็น ฟังผืด และหนัง
ที่มา: Kosmahl (n.d.)

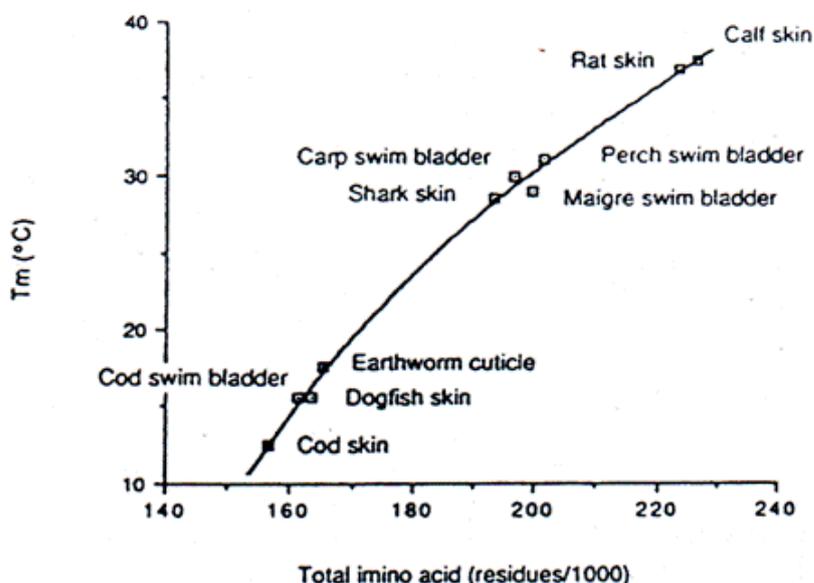
4.2 คุณสมบัติของคอลลาเจน

การที่โครงสร้างของคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเกลียวโดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อม ดังภาพที่ 5 (b) ทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงมากขึ้น ความคงตัวมากขึ้น และเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ยาก ทำให้คอลลาเจนไม่สามารถละลายน้ำได้ (Creighton, 1993) ซึ่งความแข็งแรงของคอลลาเจนโมเลกุลยังเกิดจากการสร้างสะพานเชื่อมต่อกันทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล (intra และ inter molecular cross linkage) สัตว์ที่มีอายุมากจะมีปริมาณสะพานเชื่อมเพิ่มขึ้น จึงทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงมากขึ้น (Foegeding *et al.*, 1996; Friess, 1998; มาลัยวรรณ และ วรรณวิบูลย์, 2549)

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในกรดหรือเบสเจือจาง แต่จะพองตัว และเมื่อความเข้มข้นของกรดหรือเบสมากขึ้นจะทำให้คุณสมบัติการละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากพันธะเชื่อมข้ามของคอลลาเจนถูกทำลายบางส่วน แม้ว่าที่สภาวะเป็นกลาง คอลลาเจนจะมีโครงสร้างที่แน่นและมีความแข็งแรงมาก แต่โมเลกุลเดี่ยวๆก็ยังสามารถแยกตัวออกมาได้ โดยการลด ionic strength และ pH เป็นผลให้คอลลาเจนเกิดการพองตัวและละลายในที่สุด อย่างไรก็ตาม โมเลกุลดังกล่าวยังคงสภาพเดิม (native form) คือยังคงมีฮีลิกซ์ 3 สายอยู่ และหากทำให้สภาวะดังกล่าวกลับมายู่ในสภาวะเดิมก็มีความเป็นไปได้ที่คอลลาเจนจะสามารถกลับสู่สภาพเดิม แต่สิ่งสำคัญต้องหลีกเลี่ยงความร้อน เนื่องจากฮีลิกซ์จะเสียสภาพที่อุณหภูมิระหว่าง 35-40°C สิ่งนี้เป็นสิ่งที่บ่งชี้อุณหภูมิในการหดตัว (shrink temperature) ของคอลลาเจน และจะเกิดอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิวิกฤต (critical temperature)

ซึ่งตรวจวัดโดย pyrrolidine-residue (proline และ hydroxyproline) content ในคอลลาเจน เช่น อุณหภูมิวิกฤตในการหัดตัวของคอลลาเจนจากปลา เ็นที่หางหนู และกล้ามเนื้อวัว จะอยู่ที่ประมาณ 45 61 และ 64°C ตามลำดับ และถ้าให้ความร้อนสูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนหัดตัวได้ จะทำให้คอลลาเจนเปลี่ยนเป็นเจลาติน แต่ทั้งนี้ต้องมีน้ำอยู่ด้วยในขณะที่ให้ความร้อน (Bendall, 1964; มาลัยวรรณ และ วรรณวิบูลย์, 2549)

การที่โครงสร้างคอลลาเจนประกอบด้วยโพรลีน จะช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับ โครงสร้างฮีลิกซ์ โดยช่วยในการป้องกันการหมุนของพันธะระหว่างไนโตรเจนและคาร์บอน (N-C bond) ส่วนไฮดรอกซีโพรลีน ก็มีส่วนช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับโมเลกุลของคอลลาเจน ซึ่งคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นของกรดอะมิโนน้อยจะมีการเสื่อมสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่าที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโนสูง ดังภาพที่ 8 ปริมาณกรดอะมิโนในคอลลาเจนจากปลาต่อความคงตัวต่อความร้อน (thermal stability) มีความเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของแหล่งน้ำที่สัตว์เหล่านี้อาศัยอยู่ อีกทั้งปริมาณ โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) และ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ก็สามารถส่งผลต่อความคงตัวต่อ ความร้อนของคอลลาเจนด้วย



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (โพรลีน + ไฮดรอกซีโพรลีน) ของคอลลาเจนต่างๆจากตัวอย่างต่างๆ และ molecular melting temperatures (T_m) ของคอลลาเจนเหล่านี้

ที่มา: Foegeding *et al.* (1996)

4.3 ชนิดของคอลลาเจน

ปัจจุบันสามารถแบ่งคอลลาเจนออกเป็น 25 ชนิด โดยแบ่งตามลำดับของกรดแอมิโนมวลโมเลกุล ส่วนประกอบของหน่วยย่อย (subunit) ความยาวของสายฮีลิกซ์ คุณสมบัติ และขนาดของส่วนที่ไม่เป็นฮีลิกซ์ (non-helix portion) (Friess, 1998) อีกทั้งแบ่งตามข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ และ/หรือ โปรตีน (Olsen *et al.*, 2003) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดของคอลลาเจน หน่วยย่อย และตำแหน่งที่พบ

Collagen type	Chain composition	Tissue distribution
I	$(\alpha 1(I))_2 \alpha 2(I)$, trimer $(\alpha 1(I))_3$	Skin, tendon, bone, cornea, dentin, fibrocartilage, large vessels, intestine, uterus, dermis
II	$(\alpha 1(II))_3$	Hyaline cartilage, vitreous, nucleus pulposus, notochord
III	$(\alpha 1(III))_3$	Large vessels, uterine wall, dermis, intestine, heart valve, gingiva (usually coexists with type I except in bone, tendon, cornea)
IV	$(\alpha 1(IV))_2 \alpha 2(IV)$	Basement membranes in all organs
V	$\alpha 1(V) \alpha 2(V) 3(V)$ or $(\alpha 1(V))_2 \alpha 2(V)$ or $(\alpha 1(V))_3$	Cornea, placental membranes, bone, large vessels, hyaline cartilage, gingival, tendons, interstitial tissues
VI	$\alpha 1(VI) \alpha 2(VI) \alpha 3(VI)$	Descemet's membrane, skin, nucleus pulposus, heart muscle, liver, kidney, perichondrium
VII	$(\alpha 1(VII))_3$	Skin, placenta, lung, cartilage, cornea, epidermal/dermal junction
VIII	$\alpha 1(VIII) \alpha 2(VIII)$ chain organization of helix unknown	Produced by endothelial cells, Descemet's membrane
IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	Cartilage

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Collagen type	Chain composition	Tissue distribution
X	$(\alpha 1(X))_3$	Hypertrophic and mineralizing cartilage
XI	$1\alpha 2\alpha 3\alpha_1$ or $\alpha 1(XI)$ $\alpha 2(XI)$ $\alpha 3(XI)$	Cartilage, intervertebral disc, vitreous humour
XII	$(\alpha 1(XII))_3$	Chicken embryo tendon, bovine periodontal ligament, tendons and fibril associated collagen
XIII	Unknown	Cetal skin, bone, intestinal mucosa, epidermis, hair follicles, and nail root cells
XIV	Unknown	Same as Type I
XV	Unknown	Many tissues, homology to Type XVIII
XVI	Unknown	Under study
XVII	Unknown	Hemidesmosomes and skin
XVIII	Unknown	Liver and kidney
XIX	Unknown	Eyes, brain, testes, and embryonic tissues
XX - XXV	Unknown	Unknown

ที่มา: Friess (1998); Olsen *et al.* (2003)

คอลลาเจน type I พบได้เป็นส่วนใหญ่ในสัตว์ชั้นสูง ในส่วนของหนัง เอ็น และกระดูก ซึ่งประกอบด้วย 3 สาย ได้แก่ สาย $\alpha 1(I)$ จำนวน 2 สาย และ $\alpha 2(I)$ จำนวน 1 สาย ซึ่งสาย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ จะมีส่วนประกอบของกรดแอมิโนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้อาจพบสาย $\alpha 1(I)$ จำนวน 3 สายซึ่งพบได้น้อยมาก

คอลลาเจน type II พบได้ส่วนใหญ่ในกระดูกอ่อน ประกอบด้วยสาย $\alpha 1(II)$ จำนวน 3 สาย ซึ่งเชื่อกันว่ามีลักษณะคล้ายสาย $\alpha 1(I)$

คอลลาเจน type III พบได้ปริมาณน้อย (ประมาณ 10%) ส่วนใหญ่พบในเส้นเลือด ซึ่งพบว่าคอลลาเจน type III จะจับกับคอลลาเจน type I ดังนั้น ในการสกัดคอลลาเจนส่วนใหญ่จะพบ type III ปนร่วมกับคอลลาเจน type I เล็กน้อย (Piez, 1985)

คอลลาเจน type IV มีความจำเพาะเจาะจงมาก ซึ่งพบได้เฉพาะใน loose fibrillar network (ร่างแหของเส้นใยฝอยที่เกาะกันหลวมๆ) ใน basement membrane (เยื่อแผ่นบางๆที่อยู่นอกเซลล์)

สำหรับคอลลาเจนชนิดอื่นๆจะพบในปริมาณที่น้อยมากและมีการเชื่อมโยงกับโครงสร้างทางชีววิทยาที่จำเพาะ ในการศึกษาส่วนใหญ่นิยมศึกษาคอลลาเจน type I เนื่องจากมีปริมาณมาก และมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะทางการแพทย์

5. การสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกไปเสียก่อน แล้วจึงทำให้คอลลาเจนที่มีอยู่ละลายออกมา ซึ่งการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดคอลลาเจนมีด้วยกันหลายวิธี ขึ้นกับวัตถุประสงค์เริ่มต้นว่า มีองค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากเท่าไร ซึ่งสามารถสรุปได้พอสังเขป ดังนี้ การล้างทำความสะอาด การกำจัดโปรตีนบริเวณผิวหน้า การกำจัดไขมัน การกำจัดแคลเซียม การกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous proteins) และการกำจัดเม็ดสี (pigments) ส่วนการสกัดคอลลาเจนที่มีอยู่ให้ละลายออกมาก็ทำได้หลายวิธี ขึ้นกับอายุของสัตว์และชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัด ดังนี้ (Bailey and Light, 1989; Friess, 1998)

5.1 คอลลาเจนที่ละลายในสารละลายเกลือ (Neutral salt soluble collagen)

เนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะมีคอลลาเจนชนิดนี้อยู่น้อยหรือไม่มีเลย คอลลาเจนชนิดนี้จะละลายได้ในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง (โซเดียมคลอไรด์ 0.15-2 M) หรือกรดอะซิติกเจือจาง เช่น โซเดียมคลอไรด์ 1 M และ 0.05 M Tris-HCl pH 7.4 อย่างไรก็ตามก็ยังพบคอลลาเจนชนิดนี้ในเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ที่ยังไม่มีการสร้างพันธะข้าม (crosslink) สารละลายเกลือจะสกัดโมเลกุลของคอลลาเจนในเนื้อเยื่อที่ไม่มีพันธะข้าม การสกัดจะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ อัตราการเขย่าและปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัดต่อเนื้อเยื่อ การทำบริสุทธิ์คอลลาเจนที่สกัดได้แล้วโดยการทำ

ไดอะไลซ์ (dialysed) การตกตะกอน และการเหวี่ยงแยก คอลลาเจนที่สกัดได้จะประกอบด้วย คอลลาเจน type I และ type III เล็กน้อย

5.2 คอลลาเจนที่ละลายในสารละลายกรด (Acid soluble collagen)

เป็นคอลลาเจนที่ละลายในสารละลายกรดเจือจาง เช่น กรดอะซิติก 0.5 M ซิเตรต บัฟเฟอร์ (citrate buffer) หรือ กรดไฮโดรคลอริก pH 2-3 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสกัดคอลลาเจน มากกว่าการใช้สารละลายเกลือที่เป็นกลาง พันธะเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดเจือจาง ทำให้ประจวบ triple helix ผิดกัน ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัว

5.3 คอลลาเจนที่ละลายโดยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin soluble collagen) ที่สภาวะความเป็นกรด pH 2.5

คอลลาเจนที่สกัดได้จากตัวอ่อน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สร้างใหม่ (pre-mature) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เจริญเต็มที่แล้ว (mature) โดยใช้เอนไซม์เปปซินต่อซับสเตรทเท่ากับ 1 ต่อ 10 ในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 M (pH 2.5) ที่อุณหภูมิ 4-15°C เป็นเวลา 4-72 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นกับตัวอย่างที่นำมาสกัดคอลลาเจน เอนไซม์เปปซินจะมีความจำเพาะในการตัดส่วนปลายของส่วนที่ไม่เป็นฮีลิกซ์ (non-helical regions) ทำให้ส่วนของเปปไทด์เล็กๆ หรือทีโลเปปไทด์โซน (telopeptide zone) ถูกกำจัดออกซึ่งมีผลดี เนื่องจากส่วนทีโลเปปไทด์โซนนี้จะทำให้เกิดการแพ้

การแยกชนิดของคอลลาเจนโดยใช้เกลือตกตะกอน เริ่มจากแยกสารละลายที่ได้ ภายหลังจากย่อยด้วยเปปซินหรือการสกัดด้วยกรดอะซิติก 0.5 M ที่อุณหภูมิ 4°C มาตกตะกอน คอลลาเจนโดยปรับสารละลายให้มีความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 0.7 M ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และแยกตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยง นำตะกอนที่ได้ละลายใน 0.05 M Tris-HCl + 0.15 M NaCl (pH 7.5) ที่อุณหภูมิ 4°C และนำมาไดอะไลซ์โดยใช้บัฟเฟอร์เดียวกันนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือจะทำให้สามารถแยกชนิดต่างๆของคอลลาเจนออกมาได้ ซึ่งหากต้องการนำคอลลาเจนที่ตกตะกอนนี้มาใช้ต่อ ก็สามารถนำกลับมาละลายอีกครั้งในกรดอะซิติก 0.5 M และนำมาไดอะไลซ์ในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง (0.05 M Tris-HCl + 0.15 M NaCl (pH 7.5)) การตกตะกอนและการแยกคอลลาเจนชนิดต่างๆแสดงในภาพที่ 9 ซึ่ง Bailey and Light (1989) ได้สรุปความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในการตกตะกอนคอลลาเจนชนิดต่างๆดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของเกลือที่ทำให้เกิดการตกตะกอนคอลลาเจนชนิดต่างๆ

ชนิดคอลลาเจน	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (M) ในสารละลาย 0.05 M Tris + 0.15 M NaCl (pH 7.5)
I	2.0 – 2.6
III	1.6
IV	2.0
V	4.5

ที่มา: Bailey and Light (1989)

6. คอลลาเจนจากเกล็ดปลา

6.1 การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา

จากงานวิจัยของ Ikoma *et al.* (2003 b) ได้ทำการสกัดคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลา *Pagrus major* และ *Oreochromis niloticas* โดยกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการบริเวณผิวหนังของเกล็ดปลา โดยล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10% โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 2 รอบ จากนั้นทำการกำจัดแคลเซียมโดยใช้ EDTA 0.5 mol/l เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาสกัดที่อุณหภูมิ 277 K ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 mol/l เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อแยกสกัดคอลลาเจนที่ละลายได้ในกรด และนำส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ในกรดมาสกัดโดยใช้เอนไซม์เปปซินร่วมกับกรด โดยใช้เอนไซม์เปปซินต่อส่วนที่ไม่สามารถละลายในกรดปริมาณ 1:6 โดยน้ำหนัก และใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.01 mol/l เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สุดท้ายนำคอลลาเจนที่ละลายได้ในกรด และคอลลาเจนที่ไม่ละลายในกรดมาทำให้บริสุทธิ์โดยการปรับ pH ให้เท่ากับ 7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Nagai *et al.* (2004) ได้สกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา sardine, red sea bream และ Japanese sea bass โดยนำเกล็ดปลามาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและทำแห้งแบบระเหิด (lyophilize) จากนั้นนำเกล็ดปลาที่ผ่านการทำแห้งแบบระเหิด (5.0 g) มากำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนและเม็ดสีด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C โดยเปลี่ยนสารละลายวันละครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ทำแห้ง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -85°C จนกระทั่งนำมาใช้ในการสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.5 M เป็นเวลา 3 วัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 50,000 x g เป็นเวลา 1

ชั่วโมง นำสารละลายส่วนบนมากำจัดแคลเซียมออกโดยใช้ 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) ที่มี 5 M EDTA-4 Na เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมา disaggregated ด้วย 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) ที่มี 0.5 M NaCl 0.05 M EDTA-2 Na และ 0.2 M 2-mercaptoethanol (2-ME) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibrils) ด้วยผ้าขาวบาง ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 วัน โดยเปลี่ยนสารละลายวันละครั้ง และนำไปทำแห้งแบบระเหิด จากนั้นนำเส้นใยคอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้งแบบระเหิดในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 M มาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน 10% (w/w) (EC 3.4.23.1; 2xcrystallized, 3085 U mg⁻¹ protein; Sigma, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 50,000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนบนมาไดอะไลซ์ใน 0.02 M Na₂HPO₄ (pH 7.2) เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนสารละลายวันละครั้ง และนำมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 50,000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนตะกอนมาละลายในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 M และตกตะกอนโดยเติมโซเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.9 M ตามด้วยตกตะกอนคอลลาเจนโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.4 M ที่ pH เป็นกลาง นำมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 50,000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนตะกอนมาละลายในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 M สุดท้ายนำมาทำแห้งแบบระเหิด ปริมาณคอลลาเจนที่ได้จากเกล็ดปลา sardine, red sea bream และ Japanese sea bass มีปริมาณสูงมาก โดยมีค่าเท่ากับ 50.9% 37.5% และ 41.0% (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ

Ogawa *et al.* (2004) ทำการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา black drum (*Pogonia cromis*) และปลา sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*) โดยสกัดเปรียบเทียบกันระหว่างการสกัดโดยใช้กรดและการสกัดโดยใช้เอนไซม์ โดยการสกัดด้วยกรดจะทำที่อุณหภูมิห้อง (22–23°C) ยกเว้นในขั้นตอนหมุนเหวี่ยงจะทำที่อุณหภูมิ 4°C แخذเกล็ดปลาในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M ปริมาณ 10 เท่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการกวนโดยใช้ magnetic stirrer และแช่อีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M ปริมาณ 20 เท่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองส่วนที่ไม่ละลายด้วยผ้าขาวบางและล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง นำส่วนที่ไม่ละลายมาสกัดโดยใช้สารละลายกรดอะซิติก 0.5 M ปริมาณ 10 เท่า เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารละลายมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำส่วนที่ไม่ละลายมาสกัดซ้ำอีกครั้งตามวิธีข้างต้น จากนั้นนำส่วนบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงทุกครั้งมารวมกัน และตกตะกอนด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.9 M แخذสารละลายไว้ข้ามคืน จากนั้นหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 10,000 x g เป็นเวลา 20 นาที ตะกอนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง คือ คอลลาเจน ละลายคอลลาเจนที่ได้ในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 M ปริมาณ 10 เท่า ทำการตกตะกอนด้วยเกลือและละลายด้วยกรดตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วจนครบ 3 รอบ ก่อนนำสารละลายที่ได้มาไดอะไลซ์ในสารละลายกรดอะซิ

ดิก 0.1 M สำหรับการสกัดด้วยเอนไซม์จะทำเหมือนการสกัดด้วยกรด เพียงแต่ในขั้นตอนการสกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.5 M จะเพิ่มเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุกรอบของการสกัด

Fahmi *et al.* (2004) ใช้เกล็ดปลา sea bream เป็นวัตถุดิบในการศึกษาการผลิตคอลลาเจนเปปไทด์ที่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสาร angiotensin I (Angiotensin I converting enzyme: ACE, EC3.4.15.1) เป็น angiotensin II ซึ่งมีผลทำให้ภาวะความดันโลหิตสูง (Fujita and Yoshikawa, 1999) โดยล้างทำความสะอาดเกล็ดปลาด้วยสัดส่วนเกล็ดแห้ง 100 มิลลิกรัมต่อสารละลาย sodium alginate 1 ลิตร ล้าง 10 ครั้ง และล้างออกด้วยน้ำประปา กำจัดแคลเซียมโดยแช่เกล็ดปลาในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.6 N ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของเกล็ดปลาในสารละลายเป็น 10% (w/v) ซึ่งพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลามีการเปลี่ยนแปลงไปดังตารางที่ 3 จากนั้นจะย่อยเกล็ดปลาที่ได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสในสภาวะเป็นด่าง ซึ่งพบว่าเปปไทด์จะถูกย่อยเป็นสารไฮโดรไลเซตสูงถึง 92%

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา sea bream ก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียม (% w/w)

องค์ประกอบทางเคมี	เกล็ดปลาสด	เกล็ดปลาภายหลังการกำจัดแคลเซียม
โปรตีน	51.2	70.9
ไขมัน	0.1	0
สารอินทรีย์อื่นๆ	1.4	24.4
สารอนินทรีย์	47.3	4.7

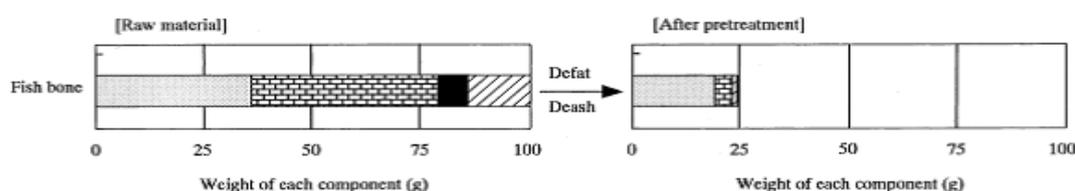
ที่มา: Fahmi *et al.* (2004)

6.2 งานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง

การสกัดคอลลาเจนจากตัวอย่างที่มีแคลเซียมในปริมาณสูง นอกจากตัวอย่างเกล็ดปลาแล้วยังมีตัวอย่างอื่น ๆ เช่น กระดูกและครีบของปลา ดังเห็นได้จากงานวิจัยของ Nagai and Suzuki (2000) ซึ่งทำการสกัดคอลลาเจนจากกระดูกและครีบปลา โดยเตรียมตัวอย่างและสกัดคอลลาเจนที่อุณหภูมิ 4°C เริ่มจากกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N และกำจัดแคลเซียมออกจากตัวอย่างโดยใช้สารละลาย 0.5 M ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) (pH 7.4) เป็นเวลา 5 วัน โดยเปลี่ยนสารละลาย EDTA วันละครั้ง สุดท้ายกำจัดไขมันออกโดยใช้

10% butyl alcohol ก่อนการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก 0.5 M เป็นเวลา 3 วัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำส่วนที่เหลือมาสกัดซ้ำในสารละลายเดียวกันอีก 2 วัน ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดจากกระดูกปลามีปริมาณเป็น 42.3% (skipjack tuna) 40.7% (Japanese sea-bass) 53.6% (ayu) 40.1% (yellow sea bream) และ 43.5% (horse mackerel) ส่วนคอลลาเจนที่สกัดได้จากครีบบปลามีปริมาณเป็น 5.2% (Japanese sea bass acid-soluble collagen) และ 36.4% (Japanese sea-bass acid-insoluble collagen)

Morimura *et al.* (2002) ทำการศึกษาการกำจัดสารอนินทรีย์จากกระดูก (spine) ปลา yellowtail fish ซึ่งเริ่มจากการกำจัดไขมัน โดยใช้ hexane 400 มิลลิลิตร (กระดูกแห้ง 60 กรัม) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และกำจัดสารอนินทรีย์จากกระดูกโดยการแช่สารละลายอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้ 0.5 M EDTA สารละลายเจือจางกรดไฮโดรคลอริก (pH 2) และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.6 N เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่ากระดูกปลาที่เหลือหลังจากการแช่ด้วยสารละลายดังกล่าวมีปริมาณ 39% 50% และ 19% ตามลำดับ พบว่ากระดูกปลาที่แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.6 N มีส่วนที่เหลือน้อยที่สุด จึงนำมาศึกษาเวลาในการแช่ต่อไป โดยศึกษาที่เวลา 8 16 และ 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณสารอนินทรีย์ลดลง เมื่อเพิ่มเวลาในการแช่สารละลาย การแช่กระดูกปลาในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.6 N ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของกระดูกในสารละลายเป็น 10% (w/v) กรองและล้างด้วยน้ำประปา ทำการแช่กรดและล้างน้ำซ้ำ 2 ครั้ง และทำแห้งที่อุณหภูมิ 60°C ความดัน -76 มิลลิเมตรปรอท เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าในการแช่สารละลายรอบแรกกระดูกปลายังมีสารอนินทรีย์คงเหลืออยู่ 5% ส่วนในรอบที่ 2 สารอนินทรีย์ลดลงเป็น 0% ดังนั้นการกำจัดแคลเซียม 2 รอบนั้น มีความจำเป็นต่อประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนินทรีย์ กระดูกปลาภายหลังการกำจัดไขมันและกำจัดแคลเซียมมีองค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลง ดังภาพที่ 10



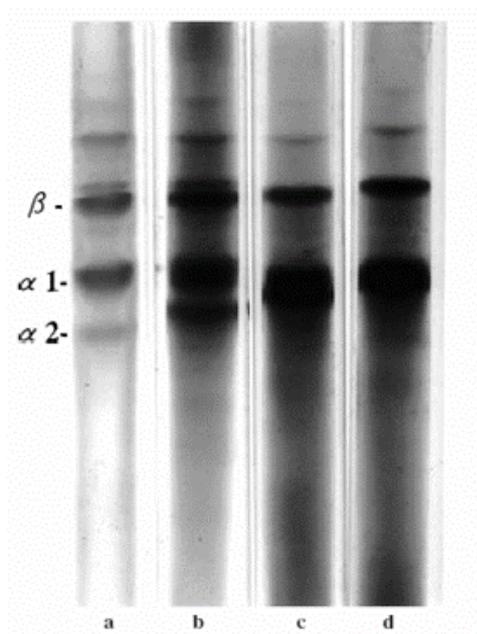
ภาพที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของกระดูกปลาก่อน (ทางซ้าย) และหลัง (ทางขวา) ผ่านการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดคอลลาเจน ค่าที่แสดงเป็นน้ำหนักแห้ง โดยที่ □ คือ โปรตีน ▨ คือ ไขมัน ■ คือ สารอนินทรีย์อื่นๆ ▩ คือ สารอนินทรีย์

ที่มา: Morimura *et al.* (2002)

Kittiphattanabawon *et al.* (2005) ทำการสกัดคอลลาเจนจากกระดูกของปลา bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) ซึ่งทำการเตรียมวัตถุดิบและสกัดคอลลาเจนที่ 4°C เริ่มจากการกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N ด้วยอัตราส่วน ตัวอย่าง:สารละลายต่างเป็น 1:10 (w/v) กวนส่วนผสมตลอด 6 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 2 ชั่วโมง และทำการกำจัดแคลเซียมด้วย 0.5 M EDTA-4Na (pH 7.4) ด้วยอัตราส่วนของแข็ง:สารละลายเป็น 1:10 (w/v) เป็นเวลา 40 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัดคอลลาเจนโดยการแช่ในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 M ด้วยอัตราส่วน ของแข็ง:สารละลาย เป็น 1:30 (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น ส่วนที่เหลือนำกลับไปสกัดอีกครั้งด้วยสภาวะเดิม นำส่วนที่กรองได้ทั้ง 2 ส่วนมารวมกัน และตกตะกอนแยกคอลลาเจนด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.6 M ในสารละลาย 0.05 M tris (hydroxymethyl) aminomethane (pH 7.0) จากนั้นนำตะกอนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 x g เป็นเวลา 60 นาที มาละลายด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.5 M ก่อนนำไปไลโซด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.1 M และน้ำกลั่น ตามลำดับ สุดท้ายนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

6.3 คุณสมบัติของคอลลาเจนจากเกล็ดปลา

คอลลาเจนที่ได้จากเกล็ดปลาเป็น คอลลาเจน type I ซึ่งเป็น heterotrimers ที่มีองค์ประกอบของ $(\alpha_1)_2\alpha_2$ ดังภาพที่ 11 คุณสมบัติทั่วไปของคอลลาเจนจากเกล็ดปลา พบว่า อุณหภูมิการเสียสภาพ (denaturation temperature) ของคอลลาเจนที่ได้จากเกล็ดปลาจะต่ำกว่าคอลลาเจนจากสัตว์บก เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนน้อยกว่าสัตว์บก ดังตารางที่ 5 ซึ่งอุณหภูมิการเสียสภาพจะขึ้นกับปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนมากกว่าปริมาณของโพรลีน ดังภาพที่ 12 (Ikoma *et al.*, 2003 b; Nagai *et al.*, 2004)



ภาพที่ 11 Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis ของคอลลาเจน type I จากหนังหมูและเกลือปลาบน 3.5% gels ที่มี 3.5 M urea โดยที่ (a) หนังหมู, (b) เกลือปลา sardine, (c) เกลือปลา red sea bream และ (d) เกลือปลา Japanese sea bass

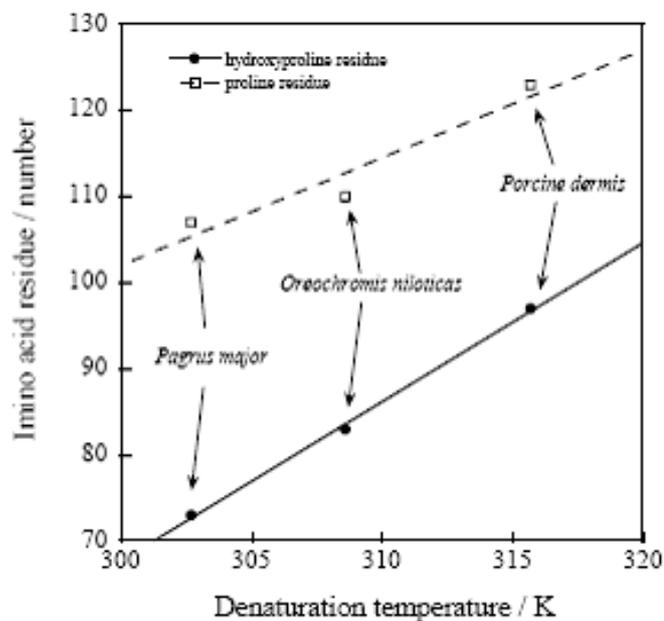
ที่มา: Nagai *et al.* (2004)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของกรดแอมิโน (residues/1000 total residues) และอุณหภูมิการเสียดสภาพ (Td) ของคอลลาเจนจากเกล็ดปลาต่างๆเทียบกับหนังหมู (Porcine dermis)

Resource	Porcine dermis ¹	<i>Pagrus major</i> ¹	<i>Oreochromis niloticus</i> ¹	Sardine ²	Red sea bream ²	Japanese sea bass ²	Black drum ³	Sheepshead ³
Hydroxyproline	97	73	83	86	87	85	87.9	86.4
Aspartic acid	44	43	47	47	46	48	ND	ND
Asx = Asp + Asn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	41.6	41.5
Threonine	16	24	24	24	26	25	25.3	24.8
Serine	33	41	36	41	39	42	37.0	38.2
Glutamic acid	72	71	72	71	72	75	ND	ND
Glx = Gln + Glu	ND	ND	ND	ND	ND	ND	63.9	63.5
Proline	123	107	110	111	109	108	111	113
Glycine	341	346	336	340	340	341	345	347
Alanine	115	133	126	115	116	114	124	124
Half-cystine	0	0	0	2	2	2	0.0	0.0
Valine	22	19	20	18	19	18	18.6	16.2
Methionine	6	15	12	13	12	12	11.6	12.2
Isoleucine	10	7	11	11	10	10	6.7	7.0
Leucine	22	18	21	22	22	23	18.7	17.7
Tyrosine	1	3	3	3	2	2	1.7	1.8
Phenylalanine	12	13	13	12	13	13	12.4	12.9
Hydroxylysine	7	7	7	ND	ND	ND	7.4	8.1
Tryptophan	ND	ND	ND	0	0	0	ND	ND
Lysine	27	26	25	25	23	24	30.2	29.7
Histidine	5	7	5	7	7	6	5.9	5.4
Arginine	48	49	49	52	55	52	51.5	51.0
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Imino acid residues (Pro + Hyp)	220	180	193	197	196	193	199	199
Td (°C)	40.7	29.8	35.5	28.5	28.0	28.0	ND	ND

ND, no data

ที่มา: ¹ Ikoma *et al.* (2003 b); ² Nagai *et al.* (2004); ³ Ogawa *et al.* (2004)



ภาพที่ 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิการเสียสภาพกับปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน และปริมาณโพรลีน

ที่มา: Ikoma *et al.* (2003 b)

7. การประยุกต์ใช้

มีการนำคอลลาเจนมาใช้ประโยชน์ทั้งแบบไม่เสื่อมสภาพ (Non-denatured collagens) และแบบเสื่อมสภาพ (Denatured collagens) เช่น คอลลาเจนแบบไม่เสื่อมสภาพจะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านเครื่องสำอาง ด้านการแพทย์ และด้านเภสัชกรรม ส่วนคอลลาเจนแบบเสื่อมสภาพ (เจลาติน คอลลาเจนไฮโดรไลเซต) จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านอาหาร และด้านการแพทย์ ซึ่งการประยุกต์ใช้คอลลาเจนในด้านการแพทย์และด้านเภสัชกรรมจะหมายความรวมถึงการรักษาโรคความดันโลหิตสูง กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (urinary incontinence) และโรคข้อกระดูกอักเสบ (osteoarthritis) อีกทั้งยังใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อ (tissue engineering) และใช้ยับยั้งการเกิดโรคอ้วน และโรคแทรกซ้อนในผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน (Ogawa *et al.*, 2004)

7.1 ระบบขนส่งตัวยา (drug delivery system)

สิ่งที่น่าสนใจสำหรับคอลลาเจนในการนำมาใช้เป็นวัสดุทางชีวภาพ คือ การที่คอลลาเจนเป็นวัสดุจากธรรมชาติที่ทำให้เกิดการแพ้ง่าย และยังเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของร่างกายอยู่แล้ว คอลลาเจนสามารถผลิตมาใช้ได้หลายรูปแบบ เช่น เป็นแผ่น เป็นฟองน้ำ (sponges) เป็นผง หรือเป็นสารละลายไวรัล เป็นต้น ทั้งหมดนี้นำไปใช้ในงานด้านการแพทย์ นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ในงานด้านจักษุวิทยา ตกแต่งบาดแผลลึกหรือบาดแผลไฟไหม้ รักษาเนื้องอก และช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อ เป็นต้น (Friess, 1998)

ฟิล์มคอลลาเจน (collagen film/ sheet/ disc) มีความหนาประมาณ 0.01–0.5 มิลลิเมตร ผลิตจากวัสดุที่ย่อยสลายได้ เช่น ผลิตจากคอลลาเจนที่ไม่มีส่วนของทีโลเปปไทด์ และมีรูปแบบการปลดปล่อยตัวยาอย่างช้าๆ ซึ่งตัวยาเหล่านี้สามารถใส่เข้าไปในฟิล์มคอลลาเจน โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจน พันธะโควาเลนต์ หรือการดักจับในโครงสร้าง (entrapment) ซึ่งสามารถผ่านการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลซ์ได้ เมื่อเกิดการย่อยสลาย (hydrolyzation) จะยังคงรักษาความแข็งแรงพอที่จะทนต่อการใช้งาน เมื่อนำฟิล์มคอลลาเจนมาใช้กับดวงตา ฟิล์มนี้จะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ภายหลังการใช้งาน 5-6 ชั่วโมง (Lee *et al.*, 2001) ฟิล์มคอลลาเจนยังใช้ในการรักษาเนื้องอกที่ติดเชื้อได้ เช่น เนื้องอกกระจกตาติดเชื้อ หรือมะเร็งตับ โดยการรักษาเนื้องอกกระจกตาติดเชื้อ จะใช้สารปฏิชีวนะ เช่น gentamicin และ tetracycline ใส่ไปในฟิล์มคอลลาเจน ผลของการใช้ฟิล์มคอลลาเจนที่มีสาร tetracycline พบว่าสามารถตรวจพบ tetracycline ในพลาสมาเป็นเวลามากกว่า 7 วัน ภายหลังการทดลองใช้ในกระต่าย (Minabe *et al.*, 1989) สำหรับการรักษามะเร็ง ฟิล์มคอลลาเจนจะใส่สารยับยั้งมะเร็ง (ectopocide (VP-16)) พบว่าสามารถรักษาระดับความเข้มข้นของตัวยาที่บริเวณเป้าหมาย (ตับ) ไว้ได้นานขึ้น (Sato *et al.*, 1996) นอกจากนี้ฟิล์มคอลลาเจนยังใช้เป็นตัวขนส่งยีน (gene delivery) ได้ อีกด้วย เช่น การกระตุ้นการสร้างกระดูก โดยใช้ recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) และคอลลาเจน พบว่าการใช้ rhBMP-2 ร่วมกับคอลลาเจนจะมีผลในการกระตุ้นการสร้างกระดูก โดยคอลลาเจนมีส่วนช่วยในการยึดเหนี่ยวเซลล์ต่างๆ และยังมีส่วนช่วยในการเชื่อมกระดูก แต่หากใช้เพียงคอลลาเจนอย่างเดียวจะไม่มีผลในการสร้างกระดูก (Murata *et al.*, 2000)

คอลลาเจนชีลด์ (collagen shields) ถูกออกแบบเพื่อเป็นสิ่งปิดกระจกตา (corneal bandages) ซึ่งสามารถละลายได้ในกระจกตา เพื่อกระตุ้นการรักษาบาดแผลภายหลังการปลูกถ่ายกระจกตา (corneal transplantation) หรือการผ่าตัดกระจกตา (radial keratotomy) คอลลาเจนชีลด์

สำหรับดวงตาผลิตจากเนื้อเยื่อเปลือกลูกตาหมู เนื่องจากมีโมเลกุลคอลลาเจนคล้ายกับคอลลาเจนของตาคนมาก คุณสมบัติทางกายภาพของคอลลาเจนชนิดที่ 1 คือ ป้องกันส่วนหน้าของกระจกตา (corneal epithelium) ที่กำลังรักษาจากการกระทบของหนังตา อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นการรักษาส่วนหน้าของกระจกตาจากการปลูกถ่ายกระจกตาและการผ่าตัดกระจกตา การขนส่งตัวของคอลลาเจนชนิดที่ 1 จะขึ้นกับปริมาณของยาและการปลดปล่อยยาของชนิดที่ 1 สำหรับตัวยาที่ละลายน้ำได้ โครงสร้างคอลลาเจนจะทำหน้าที่เสมือนที่กักเก็บ และตัวยาจะถูกดักจับไว้ในช่องว่างของโครงสร้างคอลลาเจน แต่สำหรับตัวยาที่ไม่ละลายน้ำ ตัวยาจะเข้าไปรวมกับตัวชนิดที่ 1 ขณะที่ตัวยาไหลออกมาจากชนิดที่ 1 และชนิดที่ 1 จะทำให้มีชั้นของของเหลวซึ่งทำหน้าที่หล่อลื่นผิวหน้าของตาลดการเสียดสีของหนังตากับกระจกตา เพิ่มเวลาการสัมผัสระหว่างตัวยากับกระจกตา และช่วยรักษาส่วนหน้าของกระจกตา อย่างไรก็ตาม การใช้คอลลาเจนชนิดที่ 1 เป็นตัวขนส่งตัวยา ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ลดความสามารถในการมองเห็นเนื่องจากการบดบัง และระยะเวลาที่อยู่ในบริเวณกำหนดสั้น (Lee *et al.*, 2001) อีกทั้งผลข้างเคียงของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่ง Finkelstein *et al.* (1991) ได้รายงานถึงการนำคอลลาเจนชนิดที่ 1 กับตาของกระต่ายและหนูตะเภา ผลที่ได้อาจแสดงความเป็นพิษหรืออาจเกิดจากการอักเสบขณะสอดใส่คอลลาเจนชนิดที่ 1 การอักเสบที่เกิดขึ้นในกระต่ายเกิดขึ้นหลังการสอดใส่ 7 วัน ส่วนของหนูตะเภาใช้เวลานานกว่านั้น

คอลลาเจนสปอนจ์ (collagen sponges) นิยมใช้ในการรักษาบาดแผลไฟไหม้และตกแตงบาดแผล ซึ่งเมื่อทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าได้ผลดี คอลลาเจนสปอนจ์มีความสามารถในการดูดซับของเหลวจากเนื้อเยื่อได้ปริมาณมาก ทำให้แผลแห้ง อีกทั้งยังป้องกันการกระแทกและการติดเชื้อ คอลลาเจนสปอนจ์ยังใช้เป็นตัวขนส่งตัวยาจำพวกยาคุมกำเนิด โดยมีข้อดีในเรื่องการควบคุมการปลดปล่อยสารฆ่าเชื้ออสุจิ และช่วยลดการระคายเคืองของเนื้อเยื่อ คอลลาเจนสปอนจ์สามารถเตรียมได้โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของสารละลายกรดหรือด่างที่มีคอลลาเจนพองตัวอยู่ประมาณ 0.1-5% โดยสามารถกำหนดความพรุนของคอลลาเจนสปอนจ์ได้ โดยกำหนดความเข้มข้นของคอลลาเจนในสารละลายและอัตราการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Friess, 1998; Lee *et al.*, 2001)

7.2 รักษาบาดแผล (dermal wound healing)

กระบวนการรักษาบาดแผลเป็นกลไกเชิงซ้อนที่เกี่ยวข้องกับระบบของร่างกายหลายอย่างซึ่งรวมทั้งระบบภูมิคุ้มกัน กระบวนการรักษาบาดแผลนี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ

haemostasis process และ inflammation process, proliferation และ maturation สุดท้ายคือ remodeling process

เมื่อเกิดบาดแผลขึ้น เกล็ดเลือดจะออกมาจากชั้น subendothelial collagen เป็นผลให้เกิดการรวมตัวกันของเกล็ดเลือด และกระตุ้นให้เกล็ดเลือดนี้เปลี่ยนเป็นก้อนหนาหนืด (coagulation) ต่อมา fibrin clots จะถูกสร้างขึ้น ซึ่ง fibrin clots นี้มีความจำเป็นต่อการปิดบาดแผลชั่วคราว เพื่อเตรียมสร้างโครงสร้างของเซลล์ต่างๆ เช่น neutrophil, monocyte, fibroblast และ endothelial cell นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของหลอดเลือด การปลดปล่อยสาร prostaglandin, chemotactic substances, complement factor, interleukin-1, tumor necrotic factor- α (TNF- α) และ transforming growth factor- β (TGF- β) ซึ่งเป็น bacterial product โดยมีผลไปกระตุ้นการเคลื่อนย้าย neutrophil ไปยังบาดแผล ตามด้วยการเคลื่อนย้าย macrophage, lymphocyte และ fibroblast ตามลำดับ wound macrophage ได้มาจาก blood macrophage ที่เคลื่อนมายังบริเวณบาดแผล macrophage มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการอักเสบ (inflammatory process) fibroblast จะเคลื่อนที่ไปยังช่องว่างบาดแผล เพื่อสร้างและสะสม โกลโคโปรตีนและคอลลาเจน การเคลื่อนที่เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นผลจาก macrophage derived cytokines เช่น TGF- β , epidermal growth factor (EGF) และ platelet derived growth factor (PDGF)

หลังจากเกิดบาดแผล 2-3 วัน เนื้อเยื่อที่บาดเจ็บจะเข้าสู่กระบวนการ proliferation โดย fibroblast และ endothelial cell ที่อยู่ใกล้ๆ บาดแผลจะเริ่มแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน ซึ่งเป็นผลจาก growth factors, cytokines derived platelet และ activated macrophage ต่อมา endothelial cell จะเริ่มสร้างเส้นเลือดฝอยและหลอมรวมกับท่อต่างๆ หรือ endothelial bud ซึ่งทำให้เลือดไหลเวียนได้อีกครั้ง ขณะเดียวกัน white blood cell จะเข้าสู่ apoptosis และถูก macrophage ย่อย ช่องว่างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเริ่มถูกเติมเต็มด้วยโปรติโอไกลแคน (proteoglycan), โปรโทคอลลาเจน (protocollagen) และโทรโปคอลลาเจน (tropocollagen) ซึ่งเป็นบทบาทของกระบวนการ differentiation โดยส่วนประกอบที่ปรากฏในช่องว่างบาดแผลจะเรียกว่า granulation tissue จากนั้น tensile strength ของบาดแผลจะดีขึ้นเรื่อยๆ ในระหว่างช่วง maturation และ remodeling

บาดแผลจำเป็นต้องมี barrier protection เพื่อป้องกันการติดเชื้อ ช่วยให้แผลแห้ง และเป็นโครงสร้างให้เซลล์มาเชื่อมติดกัน ดังนั้นเพื่อการรักษาบาดแผลที่สมบูรณ์จึงควรปิดบาดแผลด้วยวัสดุที่มี epidermal analogues และ dermal analogues ที่ผสมตัวยาเอาไว้ วัสดุที่เริ่มต้นของ

dermal layer ส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์จากคอลลาเจน หรือคอลลาเจนที่เชื่อมกับ extracellular matrices อื่นๆ เช่น glycosaminoglycan, hyaluronic acid หรือ fibroblast cell นอกจากคอลลาเจนจะมีความสำคัญในการเชื่อมติดเซลล์ การเติบโต และการ differentiation ของเซลล์แล้ว extracellular matrix ยังมีคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น สามารถปลดปล่อยสารที่ช่วยการเชื่อมติด กระตุ้น fibroblast proliferation และกระตุ้น fibroblast differentiation อีกด้วย (Maleeratmongkon, 2006)

จากการศึกษาของ Maleeratmongkon (2006) พบว่าคอลลาเจนจากหนังปลา giant gouramy (*Osphronemus gouramy*) มีผลทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงช่วงที่ 19 (human dermal fibroblast proliferation in 19th passage) สามารถเพิ่มการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ แต่คอลลาเจนจากเกล็ดปลา giant gouramy (*Osphronemus gouramy*) มีผลทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงช่วงที่ 19 สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เท่านั้น

7.3 บำรุงผิวหนัง ผม และเล็บ

เนื่องจากคอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีอยู่ประมาณ 30–65% ในร่างกายของสัตว์ พบตามเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อ ผม กระดูก กระดูกอ่อน ข้อต่อ ผิวหนัง และอวัยวะทุกส่วน การที่โปรตีนถูกทำลาย ก็จะทำให้คอลลาเจนในร่างกายลดลงไปด้วย ซึ่งการที่คอลลาเจนลดลงจะทำให้เกิดรอยเหี่ยวย่นพบบ่อยที่ผิวหนัง ข้อต่อเส้นเอ็นไม่แข็งแรง สูญเสียมวลกล้ามเนื้อแล้วมีการสะสมไขมันแทน ซึ่งโดยทั่วไปผู้ที่มีอายุตั้งแต่อายุ 25 ปี ระดับคอลลาเจนจะมีการลดลงประมาณปีละ 1.5% ซึ่งการลดลงของระดับคอลลาเจนนี้เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการ aging และเมื่ออายุ 45 ปี ระดับคอลลาเจนจะมีการลดลงถึง 30% (นิสา, 2550; Venus, 2007)

การใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเซต สำหรับการบำรุงผิวหนัง ผม และเล็บ มีรายงานว่าใช้ได้ผลแต่ยังไม่มีการศึกษาผลข้างเคียงของการใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเซตในกรณีดังกล่าว กลไกการทำงานยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เนื่องจากคอลลาเจนไฮโดรไลเซตมีส่วนประกอบของกรดแอมิโนเหมือนคอลลาเจน ดังนั้นจึงช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างคอลลาเจนทดแทนส่วนของร่างกายที่ถูกทำลายไป คอลลาเจนไฮโดรไลเซตไม่ช่วยทำให้กล้ามเนื้อกระชับ แต่เชื่อว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจะไปทดแทนคอลลาเจนที่เป็นส่วนประกอบของมวลกล้ามเนื้อและอวัยวะอื่นของร่างกายที่คอลลาเจนถูกทำลายไป ซึ่งคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจะถูกดูดซึมที่ทางเดินอาหารบริเวณลำไส้เล็กแล้วเข้าสู่กระแสเลือดไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย (นิสา, 2550)

7.4 ลดน้ำหนัก

กลไกการออกฤทธิ์คาดว่า คอลลาเจนไฮโดรไลเซตจะกระตุ้นการหลั่งของ growth hormone ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเสริมสร้างกล้ามเนื้อของร่างกาย หรือคอลลาเจนอาจช่วยทำให้ growth hormone เข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น โดยการหลั่งของฮอร์โมนนี้จะเกิดในช่วง 45-90 นาทีแรกของการหลับ (phase of deep sleep) นอกจากนี้ คอลลาเจนเองก็เป็นพวกโปรตีนซึ่งมีส่วนร่วมในการสร้างเนื้อเยื่อเช่นกัน โดยสรุป คือ กระบวนการนี้ทำให้ร่างกายนำคอลลาเจนและสารอาหารอื่นๆมาใช้ในการสร้างกล้ามเนื้ออย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ส่วนอาหารที่จะนำไปสร้างไขมันมีน้อยลง เป็นผลให้น้ำหนักลดลงโดยที่ไม่สูญเสียกล้ามเนื้อ (จිරพงษ์, 2550)

จากการทดลองผลิตภัณฑ์เสริมอาหารคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Slendernight) ของประเทศอังกฤษ พบว่าอาสาสมัครที่ใช้ผลิตภัณฑ์คอลลาเจนไฮโดรไลเซตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะมีขนาดเอวลดลงโดยเฉลี่ย 5.09 เซนติเมตร (2 นิ้ว) และมีน้ำหนักไขมันร่างกาย (body fat weight) ลดลง 6.64% นอกจากนี้ยังพบว่ายังช่วยในการนอนหลับและช่วยบำรุงผิวพรรณอีกด้วย (Slendernight, 2007)

7.5 โรคกระดูกและข้อต่อ (Bone and joint disease)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาความสนใจในบทบาทของโภชนเภสัช (Nutraceutical) ในการเป็นทั้งสารที่บรรเทาอาการของโรคและสารที่อาจมีผลจำเพาะต่อโรค สารเหล่านี้ เช่น glucosamine และ chondroitin sulfate ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อใช้ในการบำบัดโรคข้ออักเสบ ในการศึกษาพบว่าสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสาร nonsteroidal anti-inflammatory agents ในการจัดการโรคข้ออักเสบ ซึ่งการรักษาด้วยยาจะรวมทั้งการใช้ estrogenic hormone replacement, bisphosphonates, calcitonin, selective estrogen receptor agonists, fluorides และ parathormone โดยควรใช้ร่วมกับการออกกำลังกาย แคลเซียม และวิตามินดี

มีการใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเซตกับผู้ป่วยที่มีอาการของโรคข้ออักเสบ เนื่องจากคอลลาเจนไฮโดรไลเซตอุดมไปด้วยกรดแอมิโนที่มีบทบาทในการสร้าง cartilage matrix ซึ่งการที่หลายประเทศนิยมใช้สารนี้ ก็เนื่องจากมีความปลอดภัยและไม่มีพิษ จากการศึกษาของ Moskowitz (2000) พบว่าการบริโภคคอลลาเจนไฮโดรไลเซตปริมาณ 10 กรัม เป็นเวลามากกว่า 2 เดือน มีส่วน

ช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวดจากโรคข้ออักเสบที่หัวเข่าและสะโพก ซึ่งคาดว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซตไม่ได้แสดงผลในการเป็นยาบรรเทาอาการปวดโดยตรงหรือผลในการต่อต้านการอักเสบ แต่มีผลโดยตรงต่อเนื้อเยื่อข้อต่อ อีกทั้งยังพบว่าการใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเซตร่วมกับฮอร์โมน calcitonin มีผลในการยับยั้ง bone collagen breakdown มากกว่าการใช้เพียงฮอร์โมน calcitonin เพียงขั้นตอนเดียว

จากการทดลองของ Schunck *et al.* (2007) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง primary porcine articular และ human femoral chondrocytes ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า ซึ่งเติมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่างกัน พบว่าการเพิ่มคอลลาเจนไฮโดรไลเซตมีผลในการเพิ่ม ($p < 0.05$) การสร้างโปรติโอไกลแคน ซึ่งเมื่อตรวจวัดปริมาณสารคัดหลั่งและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับโปรติโอไกลแคน จะเห็นว่าเพิ่มขึ้นถึง 1.6 เท่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม

7.6 ภาวะความดันโลหิตสูง

Fahmi *et al.* (2004) ได้ศึกษาผลของคอลลาเจนเปปไทด์จากเกล็ดปลา sea bream ในการยับยั้งเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสาร angiotensin I (Angiotensin I converting enzyme: ACE, EC3.4.15.1) ซึ่งการเปลี่ยนสาร angiotensin I ไปเป็น angiotensin II นี้มีผลต่อการเกิดภาวะความดันโลหิตสูง (Fujita and Yoshikawa, 1999) ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ ACE ได้ 50% มีค่าเท่ากับ 0.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อทดสอบให้หนูที่มีภาวะความดันโลหิตสูงกินเปปไทด์ในปริมาณ 300 มิลลิกรัม (kg of body weight)⁻¹ d⁻¹ จะช่วยลดความดันโลหิตลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปปไทด์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE ได้แก่ กรดแอมิโนที่มีลำดับดังต่อไปนี้ Gly-Tyr, Val-Tyr, Gly-Phe และ Val-Ile-Tyr เมื่อแยกเปปไทด์เหล่านี้ออกจากสารไฮโดรไลเซต โดยใช้ chromatographic methods ความสามารถในการยับยั้ง ACE ของเปปไทด์ที่แยกออกมาจะเพิ่มขึ้น 5-20 เท่าของสารไฮโดรไลเซตที่ยังไม่ผ่านการแยกเปปไทด์เหล่านี้

7.7 การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น เช่น butylated hydroxyanisole (BHA) และ butylated hydroxytoluene (BHT) นำมาใช้ในทางการค้าเพื่อรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร โดยการ

ยึดเวลาการเปลี่ยนสีและการเสื่อมเสียอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้ถูกจำกัดในการใช้เนื่องจากความสำคัญด้านความปลอดภัยต่อสุขภาพ ดังนั้นจึงมีการแสวงหาสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัย

โปรตีนจากธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สามารถละลายได้ในน้ำ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเป็น chelating ซึ่งมีผลต่อไอออนของโลหะ โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น โปรตีนไฮโดรไลเซตของโปรตีนนม โปรตีนถั่วเหลือง และโปรตีนกลุ้มเนื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ คอลลาเจนไฮโดรไลเซต ก็แสดงคุณสมบัติในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Li *et al.*, 2007)

จากการทดลองของ Li *et al.* (2007) ได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอลลาเจนจากหนังหมูที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากเอนไซม์ผสม (เอนไซม์โปรติเอสจากตับอ่อนของสุกร เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Streptomyces* และเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus polymyxa*) แสดงคุณสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, metal chelating และ linoleic acid peroxidation system induced by Fe^{2+} สูงที่สุด อีกทั้ง degree of hydrolysis ยังมีผลอย่างสูงต่อคุณสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยไม่คำนึงถึงชนิดของเอนไซม์ โดยที่เมื่อ degree of hydrolysis เพิ่มขึ้น (ไม่เกิน 85%) ไฮโดรไลเซตนั้นจะมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติในการจับโลหะ (metal chelating) ดีขึ้น แต่เมื่อ degree of hydrolysis สูงเกิน 85% คุณสมบัติต่างๆจะแย่ลง เนื่องจากคอลลาเจนส่วนใหญ่ถูกย่อยเป็นกรดแอมิโนเดี่ยวๆ ซึ่ง Da'valos *et al.* (2004) ได้รายงานถึงกรดแอมิโนที่แสดงคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุดได้แก่ Trp, Tyr และ Met ตามด้วย Cys, His และ Phe นอกนั้น (Arg, Asn, Gln, Asp, Pro, Ala, Val, Lys, Ile, Tre, Leu, Glu และ Gly) ไม่แสดงคุณสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้ยังพบว่าเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุด คือ Gln-Gly-Ala-Arg (MW = 430.2 Da) เมื่อเทียบกับเปปไทด์อื่นที่แยกออกมา (Leu-Gln-Gly-Met (MW = 447.2 Da), Leu-Gln-Gly-Met-Hyp (MW = 560.3 Da) และ Hyl-Cys (MW = 265.1 Da))

7.8 ด้านอาหาร

คอลลาเจนเป็นผลิตภัณฑ์เหลือใช้จากเนื้อสัตว์ที่มีมากและราคาถูก โดยผลิตภัณฑ์หลักคือ เจลาติน (คอลลาเจนไฮโดรไลเซต) ซึ่งใช้เป็นสารเติมในอาหารเพื่อเพิ่มเนื้อสัมผัส ความสามารถในการอุ้มน้ำ และความเสถียรของผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด โดยคุณสมบัติของเปปไทด์ จะขึ้นอยู่กับโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสภาวะการผลิต อีกทั้งการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้กลายเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการดัดแปลงคุณสมบัติของโปรตีน (Li *et al.*, 2007)

จากการศึกษาของ Waszkowiak and Dolata (2007) ได้ประยุกต์ใช้คอลลาเจนและคอลลาเจนไฮโดรไลเซตในการเป็นตัวขนส่งสารสกัดจากโรสแมรี่ในการผลิตไส้กรอก ซึ่งสารสกัดจากโรสแมรี่ (carnosol และ carnosic acid) เป็นสารป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อสัตว์ จะเหนี่ยวนำให้เกิดสารประกอบหลายชนิดที่มีผลต่อคุณลักษณะและคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียรจึงต้องอาศัยตัวขนส่ง เพื่อให้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในผลิตภัณฑ์ ซึ่งตัวขนส่งที่นิยมใช้สำหรับสารสกัด ได้แก่ edible oils และ 1,2-propylene glycol และตัวขนส่งที่ดูดซับสารสกัดไว้ เช่น maltodextrin ก็นิยมนำมาใช้ในรูปแบบผง เพื่อสะดวกในการใช้งาน นอกจากนี้คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็นตัวขนส่ง ที่ไม่ทำให้เกิดการแพ้ในมนุษย์ ซึ่งทำให้มีการนำคอลลาเจนมาใช้ในทางการแพทย์และเภสัชวิทยา ในการเป็นตัวขนส่งสารทางชีวภาพ เช่น วิตามิน แร่ธาตุ และยา ซึ่งในการทดลองใช้คอลลาเจนและคอลลาเจนไฮโดรไลเซตเป็นตัวขนส่งสารสกัดจากโรสแมรี่ในผลิตภัณฑ์ wiener-type sausages และ liver sausages พบว่า การใช้คอลลาเจนเป็นตัวขนส่งสารสกัดโรสแมรี่ ทำให้การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้นดีกว่าการใช้สารสกัดโรสแมรี่ใส่ลงในผลิตภัณฑ์โดยตรง เนื่องจากเกิด synergistic interaction ระหว่างกรดแอมิโนของตัวขนส่งและองค์ประกอบของสารสกัดโรสแมรี่ ซึ่งกรดแอมิโนบางตัวมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีอยู่ในสารสกัดโรสแมรี่ อีกทั้งการใช้คอลลาเจนเป็นตัวขนส่งสารสกัดโรสแมรี่ จะให้ค่า peroxide values ต่ำกว่าการใช้คอลลาเจนไฮโดรไลเซต เนื่องจากบางส่วนของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตไปบดบังความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากโรสแมรี่ เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างกรดแอมิโนและสาร phenolic compound เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ที่อาจมีผลทั้งแบบ synergistic และ antagonistic ซึ่งพบว่า โพรลีนในโครงสร้างเปปไทด์ อาจเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ phenolic compound ทำให้ไปจำกัดความสามารถของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุดิบและสารเคมี

1.1 วัสดุดิบและสารเคมีสำหรับการสกัดคอลลาเจน

1.1.1 เกล็ดปลากระพงแดง (Red Snapper: *Lutjanus argentimaculatus*) จากบริษัท
บรรณวัชร ไบโอ-ไลน์ จำกัด (อ.เมือง จ.สมุทรสาคร) ประเทศไทย

1.1.2 เกล็ดปลานิล (Nile Tilapia: *Oreochromis niloticus*) จากตลาดสายเนตร (อ.คัน
นายาว จ.กรุงเทพฯ) ประเทศไทย

1.1.3 เอนไซม์เปปซิน (EC 3.4.23.1, จากกระเพาะของสุกร) activity 596 units/mg
protein จากบริษัท Fluka Biochemika

1.1.4 กรดไฮโดรคลอริก ยี่ห้อ J.T.Baker จากบริษัท J.T.Baker

1.1.5 กรดอะซิติค ยี่ห้อ J.T.Baker จากบริษัท J.T.Baker

1.1.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ยี่ห้อ Analar จากบริษัท BDH Laboratory Supplies

1.1.7 โซเดียมคลอไรด์ ยี่ห้อ UNIVAR จากบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited

1.1.8 กุ้งไคอะไลซิส ยี่ห้อ Cellu Sep (MWCO 12,000-14,000) จากบริษัท Membrane
Filtration Products Limited

1.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1.2.1 กรดไนตริก ยี่ห้อ LAB-SCAN จากบริษัท LAB-SCAN Analytical Sciences

1.2.2 กรดไฮโดรคลอริก ยี่ห้อ J.T.Baker จากบริษัท J.T.Baker

1.2.3 กรดซัลฟิวริก ยี่ห้อ J.T.Baker จากบริษัท J.T.Baker

1.2.4 กรดบอริก ยี่ห้อ Merck จากบริษัท Merck KGaA

1.2.5 เอทานอล ยี่ห้อ Merck จากบริษัท Merck KGaA

1.2.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Commercial grade)

1.2.7 คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ Analar จากบริษัท BDH Laboratory Supplies

1.2.8 โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ยี่ห้อ UNIVAR จากบริษัท Asia Pacific

Specialty Chemicals Limited

1.2.9 Methyl Red ยี่ห้อ BDH จากบริษัท BDH Chemical Limited

1.2.10 Bromocresol Green ยี่ห้อ LABCHEM จากบริษัท Ajax Finechem

1.2.11 ปีโตรเลียมอีเทอร์ ยี่ห้อ J.T.Baker จากบริษัท J.T.Baker

1.3 สารเคมีสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

1.3.1 คอลลาเจน Type I จากหนังลูกวัว (Calf skin acid soluble collagen type I, ICN 9007-34-5) จากบริษัท ICN Biomedical

1.3.2 โปรตีนมาตรฐาน (full range rainbow markers) จากบริษัท Amersham Biosciences UK Limited

1.3.3 เมธานอล ยี่ห้อ Merck จากบริษัท Merck KGaA

1.3.4 กรดอะซิติก ยี่ห้อ J.T.Baker จากบริษัท J.T.Baker

1.3.5 Acrylamide PAGE ยี่ห้อ Plus One จากบริษัท Amersham Biosciences

1.3.6 Methylenebisacrylamide ยี่ห้อ Plus One จากบริษัท Amersham Biosciences

1.3.7 Glycine ยี่ห้อ Plus One จากบริษัท Amersham Biosciences

1.3.8 Mercaptoethanol ยี่ห้อ Plus One จากบริษัท Amersham Biosciences

1.3.9 Sodium Dodecyl Sulfate (Sodium Lauryl Sulfate, SDS) จากบริษัท USB Corporation

1.3.10 Coomassie brilliant blue R-250 จากบริษัท USB Corporation

1.3.11 Ammonium persulphate จากบริษัท USB Corporation

1.3.12 N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) จากบริษัท USB Corporation

1.3.13 Bromophenol blue จากบริษัท Ajax Finechem

1.3.14 Tris (hydroxymethyl aminomethane) ยี่ห้อ Trizma[®] bass puriss จากบริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien

1.3.15 Glycerol ยี่ห้อ UNIVAR จากบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการสกัดคอลลาเจน

2.1.1 เครื่องกวนส่วนผสม (stirrer) รุ่น 51450-series ยี่ห้อ Cole Parmer

2.1.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) รุ่น BS-11 จากบริษัท Jeio Tech Limited

2.1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall RC 5C Plus

2.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Desktop centrifuge) รุ่น Z 200 A ยี่ห้อ Hermle

2.1.5 หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงแบบมีแผ่นกรอง (MWCO 3,000 kDa) รุ่น Amicon Ultra-15 ยี่ห้อ Millipore

2.1.6 เครื่องทำแห้งแบบระเหิด (Freeze dryer) รุ่น FD 2.5 จากบริษัท Heto Lab Equipment

2.1.7 เครื่องทำแห้งแบบหัวพ่นฝอย (Spray dryer) รุ่น Mobile Minor (size 0.8) ID: 3245 ยี่ห้อ GEA Nitro

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์

2.2.1 เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส รุ่น Mini-Protean II Electrophoresis Cell และ Power supply จากบริษัท Bio-Rad Laboratory

2.2.2 เครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC) ยี่ห้อ Perkin Elmer

2.2.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น Microcomputer pH-vision 6071 จากบริษัท Jenco Electronics Limited

2.2.4 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert

2.2.5 เครื่องเผาเถ้า (Muffle furnace) รุ่น Tactical 308 ยี่ห้อ Gallenkamp

2.2.6 ชุดวิเคราะห์โปรตีน ยี่ห้อ BÜCHI Labortechnik AG

2.2.7 ชุดวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT 1043 Extraction Unit ยี่ห้อ Tecator

2.2.8 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance) รุ่น Analytical Plus ยี่ห้อ Ohaus

2.2.9 ไมโครปิเปต ยี่ห้อ Pipette Man จากบริษัท Gilson S.A.S.

2.2.10 ไมโครมิเตอร์

วิธีการ

1. วิธีการเตรียมตัวอย่าง

เกล็ดปลากระพงแดงตากแห้งผ่านการล้างทำความสะอาดแล้ว นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ส่วนเกล็ดปลานิลสด นำมาล้างทำความสะอาดด้วย 10% NaCl และน้ำประปาเพื่อกำจัดเมือกและกลิ่นคาว จากนั้นตากแห้งที่อุณหภูมิ 60°C จนมีความชื้นประมาณ 15-20% และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เพื่อเป็นตัวอย่างในการทดลอง

2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา

นำเกล็ดปลากระพงแดงและเกล็ดปลานิลมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน ไนโตรเจน และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (2000) โดยในการวิเคราะห์โปรตีนจะใช้ conversion factor ของเจลาติน ซึ่งเท่ากับ 5.55 (Jones, 1931) และในการวิเคราะห์เถ้าจะต้องละลายตัวอย่างในสารละลาย $\text{HCl}:\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}$ อัตราส่วน 1:1:2 และนำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆ จนหมดควัน ตามวิธีของ Mora-Gutierrez (2007) ก่อนนำเข้าเตาเผาตามขั้นตอนของ AOAC (2000)

3. การกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลา

3.1 การกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลากระพงแดง

3.1.1 ศึกษาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและเวลาในการกำจัดแคลเซียม

ศึกษาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและเวลาในการกำจัดแคลเซียมจากเกล็ดปลากระพงแดง ซึ่งคัดแปลงจากวิธีของ Fahmi *et al.* (2004) โดยการแช่เกล็ดปลากระพงแดงทั้งเกล็ด (50 กรัม) ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 N 0.6 N 1.0 N และ 1.2 N โดยใช้อัตราส่วนเกล็ดปลาต่อกรดเป็น 1:6 (w/v) ทำการกำจัดแคลเซียมที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) และทำการกวนทุกชั่วโมง เป็นเวลา 4 และ 6 ชั่วโมง วัด pH ของสารละลายภายหลังการกำจัดแคลเซียมและ

เก็บตัวอย่างเกล็ดปลาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทุกชั่วโมง จากนั้นนำเกล็ดปลาล้างน้ำจืดมี pH เป็นกลาง (pH 6–7) สูดฟ้ายอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C จนมีความชื้นประมาณ 15-20%

ตรวจประเมินลักษณะทางกายภาพตามข้อ 3.3 และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลากะพงแดงภายหลังการกำจัดแคลเซียมเป็นเวลา 4 และ 6 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 2 จากนั้นเลือกวิธีที่กำจัดปริมาณเถ้าได้ในปริมาณสูงที่สุด

3.1.2 การปรับวิธีการกำจัดแคลเซียม เพื่อหมუნเวียนใช้สารละลายกรด

สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.2 N ที่ใช้แล้วในข้อ 3.1.1 (pH ประมาณ 1–2) นำมาหมუნเวียนใช้อีกครั้ง โดยแช่เกล็ดปลาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วนเกล็ดปลาต่อกรดเป็น 1:6 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) แยกเกล็ดปลาไปแช่ต่อในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.2 N เพื่อกำจัดแคลเซียมตามวิธีที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 วิเคราะห์ปริมาณเถ้าในเกล็ดปลาเพื่อเปรียบเทียบกับเกล็ดปลาที่ได้จากการกำจัดแคลเซียมในข้อ 3.1.1 และวัดค่า pH ของสารละลายกรดภายหลังการใช้ในการกำจัดแคลเซียม และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาหลังการกำจัดแคลเซียม (วิธีการในข้อ 2)

3.2 การกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลานิล

ทำการกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลานิลตามสภาวะที่เลือกในการกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลากะพงแดงในข้อ 3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลากะพงแดงและเกล็ดปลานิลก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียม (วิธีการในข้อ 2)

3.3 การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ

3.3.1 การตรวจประเมินลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสของเกล็ดปลา

การตรวจประเมินลักษณะปรากฏของเกล็ดปลา ทำโดยการสังเกตลักษณะความขุ่นและความโปร่งใสด้วยสายตา ส่วนการตรวจประเมินเนื้อสัมผัสของเกล็ดปลา ทำโดยการประเมินความนุ่มและความแข็งของเกล็ดปลาโดยใช้นิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มือบีบดองเกล็ดปลา

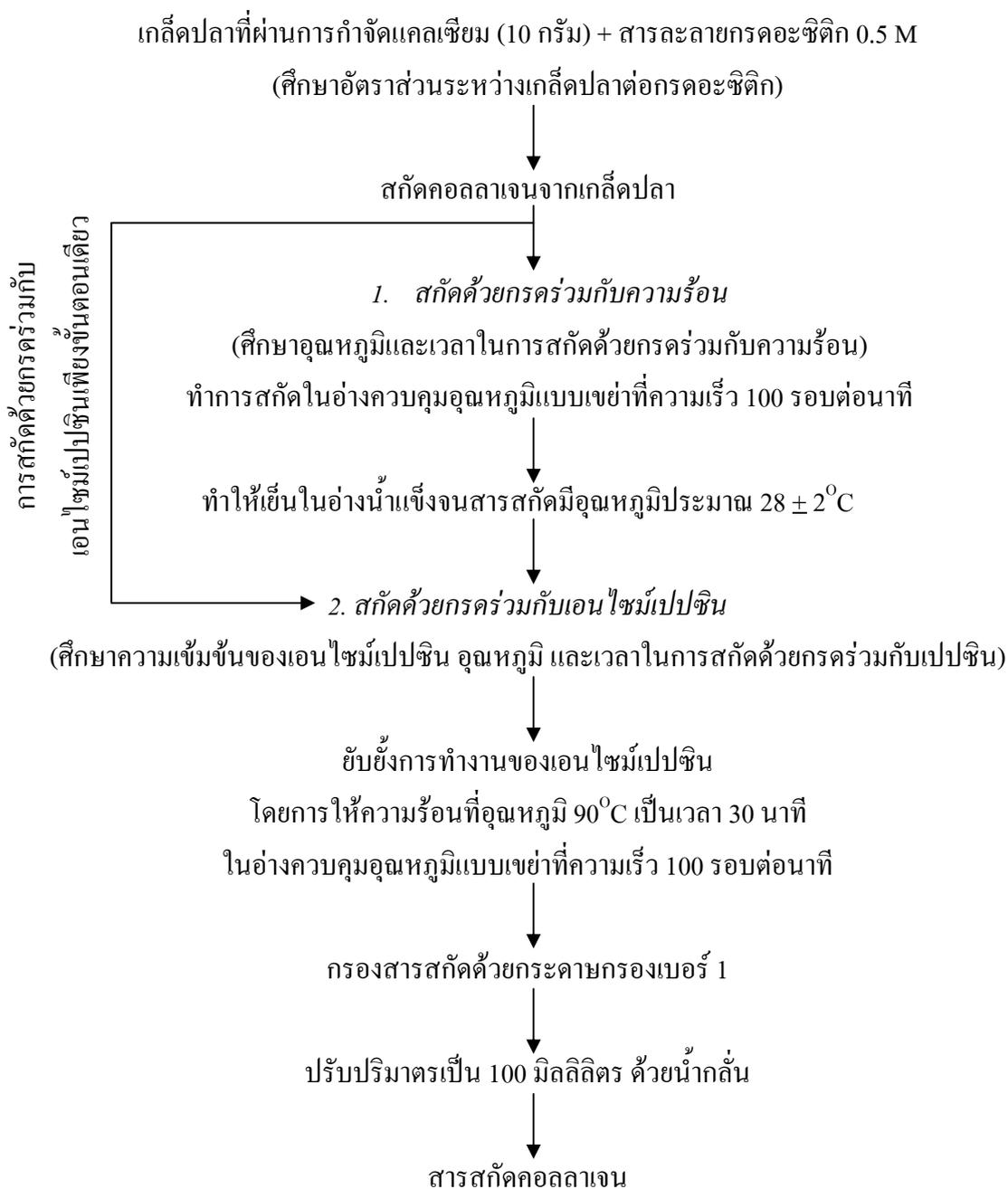
3.3.2 การวัดความหนาของเกล็ดปลา

ทำการสุ่มวัดความหนาของเกล็ดปลาจำนวน 50 เกล็ดต่อทริทแมนท์ โดยใช้ไมโครมิเตอร์วัดความหนาบริเวณกลางเกล็ดปลา

4. การสกัดคอลลาเจน

4.1 การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง

นำเกล็ดปลากะพงแดงมากำจัดแคลเซียมตามวิธีที่เลือกในข้อ 3 จากนั้นล้างเกล็ดปลาจน pH เป็นกลาง (pH 6-7) กำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนและกำจัดเม็ดสี โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N ในอัตราส่วนเกล็ดปลาต่อเบสเป็น 1:5 (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กวนตลอดเวลาโดยใช้เครื่องกวนส่วนผสม และเปลี่ยนสารละลายทุก 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเกล็ดปลาด้วยน้ำจน pH เป็นกลาง (pH 7-8) นำมาสกัดคอลลาเจนโดยเริ่มจากเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมแต่ไม่ได้ผ่านการทำแห้งปริมาณ 10 กรัม (ความชื้นของเกล็ดปลาภายหลังกำจัดแคลเซียมประมาณ 60-65%) ทำการสกัดคอลลาเจนตามวิธีการในภาพที่ 13 และศึกษาสภาวะการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา โดยนำสารสกัดคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีในข้อ 4.1.1-4.1.4 มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) และหน่วยย่อยของคอลลาเจนโดยใช้ SDS-PAGE (ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli, 1970)



ภาพที่ 13 ขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนจากเกลือปลา

4.1.1 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการสกัดด้วยกรรร่วมกับความร้อน

ทำการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาตามขั้นตอนในภาพที่ 13 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดปลาต่อสารละลายกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ให้ความร้อนในขั้นตอนการสกัดด้วยกรรร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 75 และ 90°C เป็นเวลา 1 2 3 6 9 และ 12 ชั่วโมง ตามด้วยการสกัดคอลลาเจนด้วยกรรร่วมกับเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.2 การสกัดคอลลาเจนด้วยกรรร่วมกับเอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียว

สกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาโดยใช้กรรร่วมกับเอนไซม์ตามขั้นตอนในภาพที่ 13 โดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรรร่วมกับความร้อน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดปลาต่อสารละลายกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) และใช้เอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม สกัดที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.3 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดและความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซินในการสกัดคอลลาเจน

ทำการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาตามขั้นตอนในภาพที่ 13 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดปลาต่อสารละลายกรดอะซิติกเป็น 1:3 1:5 1:7 และ 1:9 (w/v) สกัดด้วยกรรร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่เลือกในข้อ 4.1.1 ตามด้วยการสกัดคอลลาเจนด้วยกรรร่วมกับเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 0% 2.5% 5% และ 10% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.4 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการสกัดด้วยกรรร่วมกับเอนไซม์เปปซิน

ทำการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาตามขั้นตอนในภาพที่ 13 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดปลาต่อสารละลายกรดอะซิติกที่เลือกในข้อ 4.1.3 สกัดด้วยกรรร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่เลือกในข้อ 4.1.1 ตามด้วยการสกัดคอลลาเจนด้วยกรรร่วมกับเอนไซม์เปปซิน

โดยใช้เอนไซม์เปปซินความเข้มข้นที่เลือกในข้อ 4.1.3 ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) และอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

ทำการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียว (ข้อ 4.1.2) ตามขั้นตอนในภาพที่ 13 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดปลาต่อสารละลายกรดอะซิติกที่เลือกในข้อ 4.1.3 สกัดคอลลาเจนด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน โดยใช้เอนไซม์เปปซินความเข้มข้นที่เลือกในข้อ 4.1.3 ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) และอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

4.2 การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิล

ทำการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลด้วยกรดร่วมกับความร้อน ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินตามสภาวะที่เลือกในข้อ 4.1 ซึ่งศึกษาโดยใช้เกล็ดปลากะพงแดง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) และหน่วยย่อยของคอลลาเจน โดยใช้ SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ของสารสกัดคอลลาเจนที่ได้จากเกล็ดปลานิล

5. การเพิ่มความเข้มข้นโดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรน

5.1 การเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง

นำสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงที่สกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินตามวิธีที่เลือกในข้อที่ 4.1 มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรนที่มีความสามารถในการกรองแยกอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa ที่ความเร็ว $2,400 \times \text{g}$ เป็นเวลา 60 นาทีต่อรอบ จำนวน 1 และ 2 รอบ เปรียบเทียบกับการทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว $2,400 \times \text{g}$ เป็นเวลา 30 นาทีต่อรอบ จำนวน 1 2 และ 3 รอบ ที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบปริมาณของแข็งทั้งหมดและค่า pH ของสารสกัดคอลลาเจนก่อนและหลังการทำให้เข้มข้น รวมทั้ง permeate ที่ออกมา

5.2 การเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิล

นำสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลที่สกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินตามวิธีที่เลือกในข้อ 4.2 มาทำให้เข้มข้นตามวิธีที่เลือกในข้อ 5.1

6. การทำแห้งแบบพ่นฝอย

นำสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดงและเกล็ดปลานิลที่ผ่านการทำให้เข้มข้นตามวิธีที่เลือกในข้อ 5. มาทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิการทำแห้งเท่ากับ 160°C แรงดันหัวฉีด 5 กก./ซม.² โดยให้ลมร้อนออกเป็น 80-90°C ตามวิธีของสุปราณี (2539) สารที่ได้ คือ คอลลาเจนผง (collagen hydrolysate powder) จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณผลได้ (% yield) หน่วยย่อยของคอลลาเจนด้วย SDS-PAGE และอุณหภูมิการเสถียรภาพของคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลาทั้ง 2 ชนิด (ข้อ 8-9)

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนผงที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอย} \times 100}{\text{น้ำหนักเกล็ดปลาแห้งภายหลังการกำจัดแคลเซียม}}$$

7. การสกัดคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลา

การสกัดคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากระพงแดงและเกล็ดปลานิล ดัดแปลงจากวิธีของนนทพร (2550) โดยทำการกำจัดแคลเซียมตามวิธีที่เลือกในข้อ 3 จากนั้นล้างเกล็ดปลาจน pH เป็นกลาง (pH 6-7) กำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนและกำจัดเม็ดสี โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N ในอัตราส่วนเกล็ดปลาต่อเบสเป็น 1:5 (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กวนตลอดเวลาโดยใช้เครื่องกวนส่วนผสม และเปลี่ยนสารละลายทุก 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเกล็ดปลาด้วยน้ำจน pH เป็นกลาง (pH 7-8) การสกัดคอลลาเจน type I ทำตามวิธีที่เลือกในข้อ 4.1.2 และ 4.1.4 คือการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียว ดังนี้ นำเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมแต่ไม่ได้ผ่านการทำให้แห้ง 10 กรัม (ซึ่งเกล็ดปลาหลังกำจัดแคลเซียมมีความชื้นประมาณ 60-65%) ในสารละลายอะซิติก 0.5 M มาสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน โดยใช้เอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิห้อง (28±2°C) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการกรองมาตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.9 M ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ

4°C จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ตะกอนที่ได้ละลายในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M แล้วนำไปไลออลิซิสด้วยน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4°C สุดท้ายนำไปทำแห้งแบบระเหิด นำคอลลาเจน type I ที่ได้จากเกล็ดปลาทั้ง 2 ชนิด มาวิเคราะห์หาปริมาณผลได้ (% yield) หน่วยย่อยของคอลลาเจนด้วย SDS-PAGE และอุณหภูมิการเสียดสภาพ (ข้อ 8-9)

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจน type I ที่ได้จากการทำแห้งแบบระเหิด} \times 100}{\text{น้ำหนักเกล็ดปลาแห้งภายหลังการกำจัดแคลเซียม}}$$

8. ศึกษาหน่วยย่อยของคอลลาเจนโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamine Gel)

ศึกษาหน่วยย่อยของคอลลาเจนที่สกัดได้จากข้อ 4, 6, 7 และคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว (Calf skin acid soluble collagen type I, ICN 9007-34-5, ICN Biomedical, Livermore, CA, USA) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE (ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli, 1970) การเตรียมตัวอย่างคอลลาเจนผงในข้อ 6 เตรียมโดยละลายคอลลาเจนผงในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5% (w/v) ส่วนคอลลาเจน type I จากข้อ 7 และคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว เตรียมโดยละลายคอลลาเจนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลาย SDS ความเข้มข้น 5% และมี 2-mercaptoethanol ความเข้มข้น 5% เป็นตัวรีดิวซ์ (สลายพันธะไดซัลไฟด์) จากนั้นนำสารละลายคอลลาเจนที่เตรียมด้วยวิธีดังกล่าวและสารละลายคอลลาเจนในข้อ 4 มาเจือจาง 1:4 เท่า ด้วย sample buffer (50 ไมโครลิตร ต่อ sample buffer 200 ไมโครลิตร) จากนั้นใส่ตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม และทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 16.5% separating gel และ 4% stacking gel หรือ 7.5% separating gel และ 4% stacking gel สำหรับสังเกตหน่วยย่อย β , α_1 และ α_2 โดยเปรียบเทียบกับคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว และย้อมสีด้วย Coomassie blue R250 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเปรียบเทียบกับ full range rainbow marker (Amersham Biosciences UK Limited, UK) น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-250 kDa ซึ่งประกอบด้วย Blue color (250 kDa) Red color (160 kDa) Green color (105 kDa) Yellow color (75 kDa) Purple color (50 kDa) Blue color (35kDa) Orange color (30 kDa) Green color (25 kDa) Blue color (15 kDa) และ Red color (10 kDa)

9. วิเคราะห์สมบัติความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน

เตรียมตัวอย่างคอลลาเจนสำหรับศึกษาความคงตัวต่อความร้อน ตามวิธีของนันทพร (2550) โดยนำคอลลาเจนผงและคอลลาเจน type I ที่สกัดจากเกล็ดปลากระพงแดงและเกล็ดปลานิลที่เตรียมตามวิธีในข้อ 4–6 และ ข้อ 7 ตามลำดับ เติมน้ำปราศจากไอออนเข้าไปในตัวอย่าง โดยสัดส่วนตัวอย่างต่อน้ำเท่ากับ 1:40 (w/v) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นชั่งน้ำหนักใส่ใน stainless steel pan ประมาณ 15 มิลลิกรัม ปิด pan ให้สนิท แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 วัน นำไปวิเคราะห์ความคงตัวต่อความร้อนโดยใช้เครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) โดยใช้อัตราในการให้ความร้อน (heating rate) เท่ากับ 1°C ต่อนาที ในช่วงอุณหภูมิ 20–50°C ค่าที่ใช้ในการศึกษาความคงตัวต่อความร้อน ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้นที่มีการดูดกลืนความร้อนในการเสียสภาพ (onset temperature, T_o) อุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด (peak maximum temperature, T_p) และอุณหภูมิสุดท้ายในการดูดกลืนความร้อน (recovery temperature, T_r)

10. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

10.1 การกำจัดแคลเซียม

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของความหนา และองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา ภายหลังจากกำจัดแคลเซียม วางแผนการทดลองแบบ 2x4 factorial in CRD วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

10.2 การสกัดคอลลาเจน

10.2.1 การศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน วางแผนการทดลองแบบ 2x6 factorial in CRD วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

10.2.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างเกลือต่อกรดและความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซิน

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน วางแผนการทดลองแบบ 4x4 factorial in CRD วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

10.2.3 การศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน วางแผนการทดลองแบบ 2x3 factorial in CRD วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

10.3 การเพิ่มความเข้มข้นโดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรน

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณของแข็งทั้งหมดของสารสกัดคอลลาเจนก่อนและหลังการทำให้เข้มข้น วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

11. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

12. ระยะเวลาทำการวิจัย

การทดลองเริ่มเดือนมีนาคม 2549 สิ้นสุดเดือนธันวาคม 2550

ผลและวิจารณ์

1. องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา

จากองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลากระดูกงูและเกล็ดปลานิลในตารางที่ 6 จะเห็นว่าองค์ประกอบหลักของเกล็ดปลาทั้ง 2 ชนิด คือ โปรตีน และ เถ้า โดยที่เกล็ดปลานิลจะมีปริมาณโปรตีนมากกว่า และปริมาณเถ้าต่ำกว่าเกล็ดปลากระดูกงู ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fahmi *et al.* (2004) ที่แสดงถึงองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา sea bream พบว่า ประกอบด้วยโปรตีนและสารอนินทรีย์เป็นหลัก ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ โปรตีน 51.2% ไขมัน 0.1% สารอนินทรีย์อื่นๆ 1.4% และสารอนินทรีย์ 47.3% โดย Ikoma *et al.* (2003 a) รายงานว่าเกล็ดปลา *Pagrus major* ประกอบด้วย extracellular matrix ที่มีคอลลาเจน type I และ calcium-deficient hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ประกอบอยู่ในโครงสร้าง

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมี (% น้ำหนักแห้ง) ของเกล็ดปลา

องค์ประกอบทางเคมี	เกล็ดปลากระดูกงู	เกล็ดปลานิล
คาร์โบไฮเดรต*	3.11	4.33
โปรตีน**	47.87 ± 1.22	60.01 ± 0.54
ไขมัน	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.01
เถ้า	49.01 ± 0.01	35.62 ± 0.48

หมายเหตุ ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* คำนวณจาก $100 - (\% \text{โปรตีน} + \% \text{ไขมัน} + \% \text{เถ้า})$

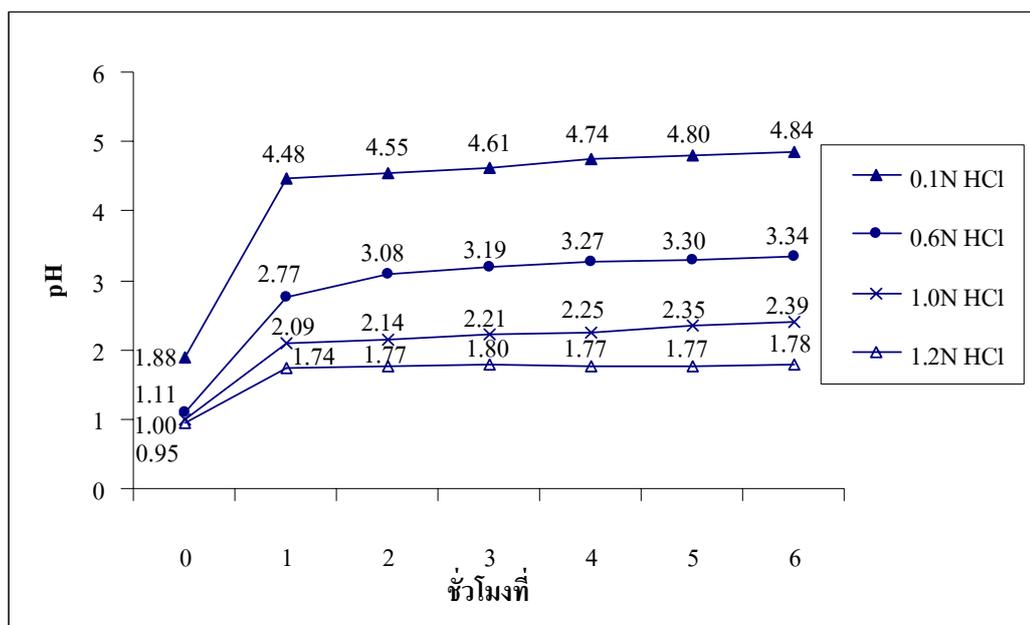
** ใช้ conversion factor ของเจลาติน ซึ่งเท่ากับ 5.55 (Jones, 1931)

2. การกำจัดแคลเซียมจากเกล็ดปลาก่อนการสกัดคอเลสเตอรอล

2.1 การหาสถานะการกำจัดแคลเซียมจากเกล็ดปลากระดูกงูแดง

2.1.1 pH ของสารละลายในระหว่างการกำจัดแคลเซียม

ในระหว่างการกำจัดแคลเซียม การเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายเกล็ดปลาในกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 1 ชั่วโมงแรก และค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนครบ 6 ชั่วโมง ดังภาพที่ 14 โดยอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของ pH จะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดน้อยลง



ภาพที่ 14 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ขณะทำการแช่เกล็ดปลากะพงแดงในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นต่างๆ นาน 6 ชั่วโมง

การที่ pH ของสารละลายเพิ่มขึ้น เกิดจากการที่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกทำปฏิกิริยากับแคลเซียมในตัวอย่างเกล็ดปลา (insoluble calcium-salt) เกิดเป็นเกลือ (soluble calcium-salts) ละลายออกมา และในระหว่างการกำจัดแคลเซียมด้วยกรด จะสังเกตเห็นฟองก๊าซเกิดขึ้น ซึ่ง

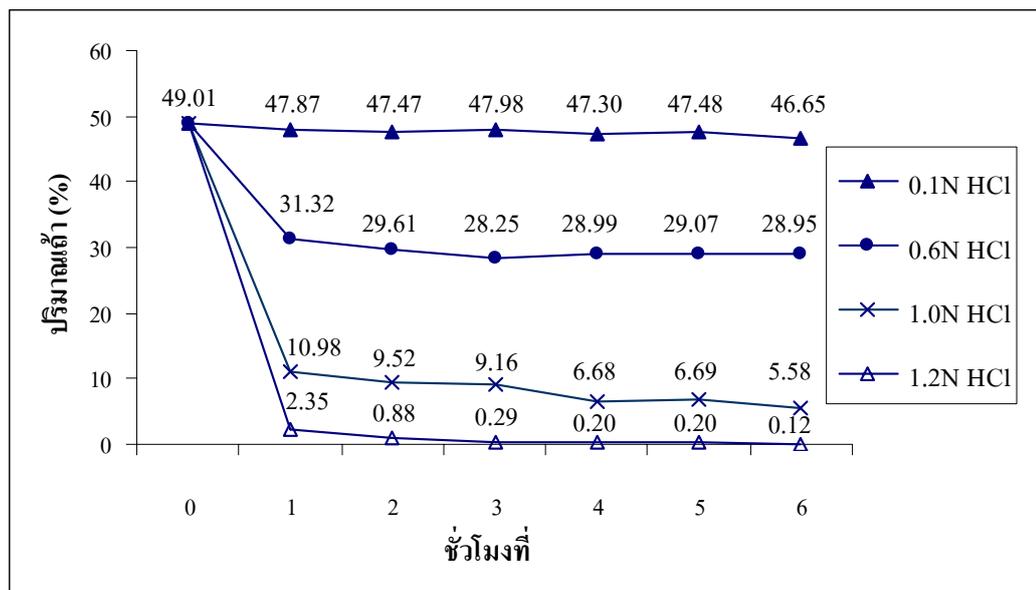
ฟองก๊าซที่เกิดอาจเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังปฏิกิริยาที่ Verdenius and Alma (1958) แสดงไว้ในการกำจัดแคลเซียมจากตัวอย่างกระดูก



จากภาพที่ 14 จะพบว่า การกำจัดแคลเซียมในช่วง 1 ชั่วโมงแรก มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว ทำให้ pH เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะช้าลงเป็นผลให้ pH เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และการแช่เกลือปลาในสารละลายกรดที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้การเปลี่ยนแปลงของ pH ช้ากว่าสารละลายกรดที่มีความเข้มข้นต่ำ

2.1.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเถ้าของเกลือปลาที่แช่ในระหว่างการกำจัดแคลเซียม

การเปลี่ยนแปลงปริมาณเถ้าของเกลือปลาที่แช่ในระหว่างการแช่กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นต่างๆ ในระหว่างการกำจัดแคลเซียม มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงแรก และค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ จนครบ 6 ชั่วโมง ดังภาพที่ 15 โดยที่เกลือปลาที่แช่เริ่มต้นจะมีปริมาณเถ้าเป็น 49.01% (น้ำหนักแห้ง) เมื่อผ่านการแช่กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 N พบว่าปริมาณเถ้าจะลดลงน้อยมาก เมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณเถ้าของเกลือปลาที่แช่ในระหว่างการแช่กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.6 N 1.0 N และ 1.2 N และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ปริมาณเถ้าลดลงได้มาก โดยเกลือปลาที่ผ่านการแช่กรดไฮโดรคลอริก 0.1 N 0.6 N 1.0 N และ 1.2 N นาน 6 ชั่วโมง จะมีปริมาณเถ้าลดลงเหลือ 46.65% 28.95% 5.58% และ 0.12% (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งปริมาณเถ้าที่ลดลงนั้นจะบ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดแคลเซียม คือ ยิ่งปริมาณเถ้าลดลงมาก นั่นคือความสามารถในการกำจัดแคลเซียมยิ่งมากขึ้น



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเก่าของเกลือปลากระพงแดงภายหลังการแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นต่างๆ นาน 6 ชั่วโมง

การที่ปริมาณเก่า (สารอนินทรีย์) ลดลง เมื่อกำจัดแคลเซียมด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นมากกว่า เนื่องจากการเพิ่มปริมาณกรดไฮโดรคลอริกทำให้สมดุลของสมการที่ Verdenius and Alma (1958) แสดงไว้ดำเนินไปข้างหน้า มีผลในการช่วยละลายแคลเซียมในตัวอย่างออกมาตามหลักของ Le Chatelier (Verdenius and Alma, 1958)

2.1.3 ลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสของเกลือปลาภายหลังการกำจัดแคลเซียม

ลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสของเกลือปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม พบว่าการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน จะทำให้เกิดเกลือปลามีลักษณะต่างจากเกลือปลาเริ่มต้นดังตารางที่ 7 เมื่อความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเพิ่มขึ้น เกลือปลาจะมีลักษณะนิ่มขึ้นและใสขึ้น แต่การแช่กรดไฮโดรคลอริกที่เวลา 4 หรือ 6 ชั่วโมง ในสารละลายกรดที่มีความเข้มข้นเท่ากัน จะไม่มีผลต่อลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสของเกลือปลาที่ได้ และเมื่อสังเกตความใสของตัวอย่างเกลือปลาที่ผ่านการแช่กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จะพบว่าการกำจัดแคลเซียมบริเวณขอบรอบนอกของเกลือปลาจะเสร็จสมบูรณ์ก่อน เนื่องจากบริเวณขอบรอบนอกของเกลือปลามีความบางกว่าบริเวณกลางเกลือ และอาจเป็นเพราะกรดแทรกซึมเข้าไปใน

เกล็ดปลาบริเวณขอบก่อน ทำให้เกล็ดที่เซไฮโดรคลอริก 0.6 N มีลักษณะบริเวณขอบใส แต่ตรงกลางขุ่น

ตารางที่ 7 ลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสของเกล็ดปลาเริ่มต้นและเกล็ดปลาภายหลังการกำจัดแคลเซียม โดยการแช่กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการแช่	ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก				
	เริ่มต้น	0.1 N HCl	0.6 N HCl	1.0 N HCl	1.2 N HCl
4 ชั่วโมง	 เกล็ดแข็ง ขุ่นทั้งเกล็ด	 เกล็ดนุ่มขึ้น ขุ่นน้อยลง	 เกล็ดนุ่มขึ้น บริเวณขอบใสขึ้น แต่ตรงกลางขุ่น	 เกล็ดนุ่ม ใสทั้งเกล็ด	 เกล็ดนุ่ม ใสทั้งเกล็ด
6 ชั่วโมง	 เกล็ดแข็ง ขุ่นทั้งเกล็ด	 เกล็ดนุ่มขึ้น ขุ่นน้อยลง	 เกล็ดนุ่มขึ้น บริเวณขอบใสขึ้น แต่ตรงกลางขุ่น	 เกล็ดนุ่ม ใสทั้งเกล็ด	 เกล็ดนุ่ม ใสทั้งเกล็ด

เกล็ดปลาจะพองแดงก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียม เมื่อดึงหรือฉีกเกล็ดปลาด้วยมือ พบว่าค่อนข้างฉีกขาดยาก สอดคล้องกับรายงานของ Ikoma *et al.* (2003 a) ซึ่งติดตาม tensile stress-strain curve ของเกล็ดปลา *Pagrus major* ก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียม และได้รายงานค่า tensile strength และค่า Young's modulus (stress/strain) ก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียมว่าลดลง จาก 93 ± 1.8 MPa เป็น 36 ± 8.4 MPa และ จาก 2.2 ± 0.3 GPa เป็น 0.53 ± 0.06 GPa ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงเกล็ดปลาที่นุ่มขึ้นภายหลังการกำจัดแคลเซียม แต่เกล็ดปลาจะยังคงเหนียวและฉีกขาดได้ยาก

2.1.4 ความหนาของเกล็ดปลากระพงแดงภายหลังการกำจัดแคลเซียม

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมีผลต่อความหนาของเกล็ดปลาหลังการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ($p \leq 0.05$) แต่เวลาในการแช่และผลรวมของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกกับเวลาในการแช่ไม่มีผลต่อความหนาของเกล็ดปลา ($p > 0.05$) ซึ่งความหนาของเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมจะมีความแตกต่างจากเกล็ดปลาเริ่มต้น โดยที่จะมีความหนาลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อแช่ในกรดที่มีความเข้มข้นสูง ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ความหนาของเกล็ดปลา (มิลลิเมตร) หลังผ่านการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ความเข้มข้นของสารละลาย กรดไฮโดรคลอริก	ระยะเวลาการแช่	
	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
เกล็ดปลาเริ่มต้น	0.572 ± 0.19	0.572 ± 0.19
0.1 N	0.419 ± 0.11^a	0.423 ± 0.13^a
0.6 N	0.417 ± 0.11^a	0.392 ± 0.14^a
1.0 N	0.262 ± 0.09^b	0.249 ± 0.08^b
1.2 N	0.217 ± 0.06^b	0.231 ± 0.06^b

หมายเหตุ \pm คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a-b} เปรียบเทียบทั้งแนวตั้งและแนวนอน อักษรห้อยที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เกล็ดปลาเริ่มต้นมีความหนาเฉลี่ย 0.572 มิลลิเมตร เมื่อแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 N ความหนาจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกจนถึง 1.2 N ความหนาของเกล็ดปลาจะลดลงมากกว่า 50% ของความหนาเกล็ดปลาเริ่มต้นก่อนแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริก โดยมีค่าเท่ากับ 0.217 และ 0.231 มิลลิเมตร ที่เวลาการแช่นาน 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยที่ความหนาของเกล็ดปลาที่ผ่านการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 และ 1.2 N จะมีความหนาของเกล็ดไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และเกล็ดปลาที่ผ่านการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 และ 0.6 N ก็จะมีความหนาของเกล็ดไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เช่นกัน แต่ความหนาจะน้อยกว่าเกล็ดปลาเริ่มต้น และมากกว่าเกล็ดปลาที่ผ่านการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 และ 1.2 N

การที่เกล็ดปลาที่มีความหนาลดลง เนื่องจากผ่านการกำจัดแคลเซียมที่อยู่บริเวณ ผิวหน้าและภายใน โครงสร้างเกล็ดปลา ทำให้เมื่อนำเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมมาทำแห้งและ วัดความหนา เกล็ดปลาจะเกิดการยุบตัวในระหว่างการทำแห้ง และเป็นสาเหตุให้ความหนาของเกล็ด ปลาลดลงจากเกล็ดปลาเริ่มต้น และทำให้เกล็ดปลามีลักษณะใสและนึ่มขึ้น ดังปรากฏในตารางที่ 7

2.1.5 องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลากะพงแดงภายหลังการกำจัดแคลเซียม

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาเริ่มต้น และเกล็ดปลาที่ผ่านการ กำจัดแคลเซียมด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1–1.2 N พบว่าองค์ประกอบทางเคมี ของเกล็ดปลา 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง) มีปริมาณเปลี่ยนแปลงไป โดยที่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ เถ้า มีสัดส่วนลดลง ส่วน โปรตีนมีสัดส่วนสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดเพิ่มขึ้น ดัง ตารางที่ 9

เมื่อดูผลของปริมาณเถ้า พบว่าเวลาในการแช่และความเข้มข้นของกรดไฮโดร คลอริกมีผลต่อปริมาณเถ้าของเกล็ดปลา ($p \leq 0.05$) แต่ผลรวมของเวลาในการแช่และความเข้มข้น ของกรดไฮโดรคลอริกไม่มีผลต่อปริมาณเถ้าของเกล็ดปลาหลังการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ($p > 0.05$) ปริมาณเถ้าของเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมจะมีความแตกต่างจากเกล็ดปลาเริ่มต้น โดยที่จะมีปริมาณเถ้าลดลง เมื่อแช่ในกรดที่มีความเข้มข้นสูงและใช้เวลาในการแช่นาน ซึ่งวิธีที่ให้ ปริมาณเถ้าต่ำมากพอ คือ การแช่เกล็ดปลาในสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.2 N เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีปริมาณเถ้าเหลือเท่ากับ 0.12% (น้ำหนักแห้ง)

ส่วนปริมาณโปรตีน พบว่าความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมีผลต่อปริมาณ โปรตีนของเกล็ดปลาหลังการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ($p \leq 0.05$) แต่เวลาในการแช่และผล รวมของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกกับเวลาในการแช่ไม่มีผลต่อปริมาณ โปรตีนของ เกล็ดปลา ($p > 0.05$) ปริมาณโปรตีนของเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมจะมีความแตกต่างจาก เกล็ดปลาเริ่มต้น โดยที่จะมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อแช่ในกรดที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเกล็ดปลาที่ ผ่านการแช่สารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.2 N เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนเป็น องค์ประกอบอยู่สูงถึง 99.79% (น้ำหนักแห้ง) ทั้งนี้เนื่องจากสารอนินทรีย์ (เถ้า) ในเกล็ดปลาถูก กำจัดออกไป จึงทำให้สัดส่วนของโปรตีนในเกล็ดปลาภายหลังการกำจัดแคลเซียมเพิ่มสูงขึ้นถึง 99.79% (น้ำหนักแห้ง)

ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณ มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมากขึ้น แต่ไม่ได้วิเคราะห์ทางสถิติเนื่องจากเป็นค่าจากการคำนวณ ส่วนปริมาณไขมัน พบว่าเกิดคปลาที่ผ่านการแช่กรดไฮโดรคลอริกทุกความเข้มข้น ทั้ง 4 และ 6 ชั่วโมง จะไม่สามารถตรวจพบปริมาณไขมันได้ด้วยวิธี AOAC (2000)

ตารางที่ 9 องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ภายหลังจากการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เวลาที่ใช้ในการแช่ (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น HCl (N)	กรัมต่อเกล็ดปลา 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง)			
		คาร์โบไฮเดรต*	โปรตีน**	ไขมัน	เถ้า
เกล็ดปลาเริ่มต้น	-	3.11	47.87 ± 1.20	0.01 ± 0.01	49.01 ± 0.01
4	0.1	2.55	50.15 ± 0.44 ^a	ND	47.30 ± 0.67 ^a
	0.6	1.38	69.63 ± 1.69 ^b	ND	28.99 ± 0.00 ^c
	1.0	0.68	92.64 ± 0.31 ^c	ND	6.68 ± 0.09 ^d
	1.2	0.13	99.67 ± 0.37 ^c	ND	0.20 ± 0.04 ^f
6	0.1	3.03	50.32 ± 0.66 ^a	ND	46.65 ± 0.33 ^b
	0.6	1.00	70.05 ± 0.52 ^b	ND	28.95 ± 0.00 ^c
	1.0	0.36	94.06 ± 0.56 ^d	ND	5.58 ± 0.11 ^c
	1.2	0.09	99.79 ± 0.93 ^c	ND	0.12 ± 0.05 ^g

หมายเหตุ : ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a-g} เปรียบเทียบในแนวตั้ง อักษรห้อยที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

* คำนวณจาก $100 - (\% \text{โปรตีน} + \% \text{ไขมัน} + \% \text{เถ้า})$

** ใช้ conversion factor ของเจลาติน ซึ่งเท่ากับ 5.55 (Jones, 1931)

ND = not detected

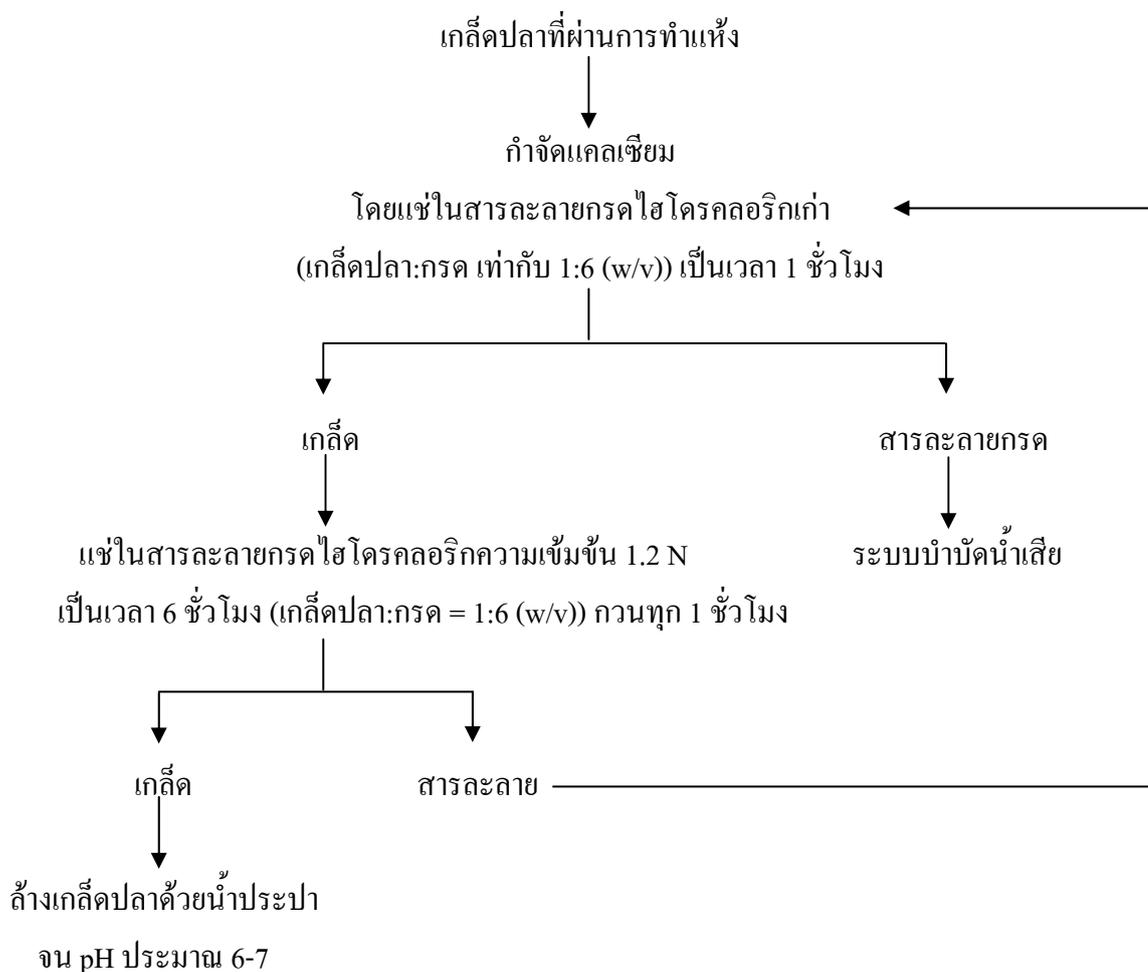
จากการทดลองจะเห็นว่าในขั้นตอนการกำจัดแคลเซียมนั้น ไม่เพียงแต่จะช่วยลดปริมาณของเถ้า (สารอนินทรีย์) ลง แต่ยังลดปริมาณของไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ลงอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Morimura *et al.* (2002) ที่ได้ทำการกำจัดแคลเซียมและกำจัดไขมันจากตัวอย่างกระดูกปลา yellowtail fish โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.6 N และ hexane

ตามลำดับ พบว่าไม่เพียงแต่ปริมาณไขมันและสารอินทรีย์จะลดลง แต่ยังคงปริมาณโปรตีน และสารอินทรีย์อื่นๆลงด้วย

จากผลการทดลองในข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.5 ทำให้เลือกทริทเมนต์ในการกำจัดแคลเซียมได้ คือ การกำจัดแคลเซียมด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.2 N เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนการสกัดคอลลาเจน เนื่องจากให้ปริมาณเถ้าที่เหลือน้อยที่สุด (0.12% (น้ำหนักแห้ง)) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งเกลือปลาอะพอสเฟตที่ผ่านการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกจะถูกกรดละลายแคลเซียมภายในเกลือปลาออกมาในสารละลาย เป็นผลให้สารละลายมี pH สูงขึ้น และทำให้เกลือปลาหลังจากแช่สารละลายดังกล่าวมีปริมาณเถ้าลดลง อีกทั้งยังเป็นผลให้เกลือปลาดังกล่าวมีความหนืดลดลงอีกด้วย โดยการกำจัดแคลเซียมจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงแรก จากนั้นจะมีการกำจัดแคลเซียมอย่างช้าๆจนครบ 6 ชั่วโมง

2.2 การปรับวิธีการกำจัดแคลเซียม เพื่อปรับปรุงคุณภาพสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เหลือภายหลังจากแช่เกลือปลาอะพอสเฟต

เนื่องจากการแช่เกลือปลาอะพอสเฟตด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.2 N เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งในการทดลองนี้เรียก “วิธีเดิม” สารละลายกรดไฮโดรคลอริกภายหลังการแช่เกลือปลาอะพอสเฟตมี pH สุดท้ายอยู่ที่ 1.78 (ภาพที่ 14) ซึ่งมีความเป็นกรดสูง ทำให้ยากต่อการบำบัดน้ำ ดังนั้นจึงนำสารละลายดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์ก่อน โดยนำสารละลายกรดนี้มาเป็นสารละลายที่ใช้แช่เกลือปลาอะพอสเฟตก่อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเป็นการเตรียมเกลือปลาให้มีสภาวะเหมาะสมก่อนการกำจัดแคลเซียมด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.2 N เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า “วิธีใหม่” ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ขั้นตอนการกำจัดแคลเซียมด้วย “วิธีใหม่”

จากตารางที่ 10 จะเห็นว่าองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลากะพงแดงที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมทั้ง 2 วิธี มีองค์ประกอบทางเคมีที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณเถ้าของเกล็ดปลากะพงแดงที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมด้วยวิธีใหม่ พบว่ามีปริมาณเถ้าคงเหลือในเกล็ดปลากะพงแดงเป็น 0.18% (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณเถ้าของเกล็ดปลากะพงแดงที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมด้วยวิธีเดิม (0.12% (น้ำหนักแห้ง)) ทั้งนี้เนื่องจากการแช่เกล็ดปลาในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ผ่านการแช่เกล็ดปลาแล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มี pH สุดท้ายอยู่ที่ 1.78 ซึ่งมี pH ใกล้เคียง pH เริ่มต้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N (1.88) ซึ่งเมื่อดูจากภาพที่ 15 พบว่าปริมาณเถ้าของเกล็ดปลาที่ผ่านการแช่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 N นั้นปริมาณเถ้าเมื่อผ่านการแช่ไป 1 ชั่วโมง ลดลงจากเริ่มต้นน้อยมาก ซึ่งลดลงเหลือ 47.87% (น้ำหนักแห้ง) เมื่อเทียบกับปริมาณเถ้าของเกล็ดปลาเริ่มต้น 49.01% (น้ำหนักแห้ง)

แต่เมื่อพิจารณาถึงค่า pH ของสารละลายภายหลังการกำจัดแคลเซียมทั้ง 2 วิธี พบว่า pH ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.2 N ที่ผ่านการแช่เกลือปลากะพงแดง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มี pH เปลี่ยนแปลงจาก 0.95 เป็น 1.78 (ข้อมูลจากภาพที่ 14) และเมื่อนำ สารละลายนี้ไปแช่เกลือปลากะพงแดงชุดใหม่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง pH ของสารละลายจะเพิ่มสูงขึ้น เป็น 3.28 จะเห็นว่าความเป็นกรดของสารละลายลดลงจากเดิม ทำให้ง่ายต่อการบำบัดน้ำทิ้ง ซึ่งเหตุ ที่ใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ผ่านการแช่เกลือปลามาแล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มาแช่เพียง 1 ชั่วโมง เนื่องจาก pH ของสารละลายจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 1 ชั่วโมงแรกเท่านั้น ดังกราฟ ภาพที่ 14 จะเห็นได้ว่าการกำจัดแคลเซียมด้วยวิธีใหม่นี้จะสามารถลดความเป็นกรด (pH สูงขึ้น) ของสารละลายก่อนปล่อยลงสู่แหล่งธรรมชาติ ซึ่งการเพิ่มขึ้นตอนการกำจัดแคลเซียมเพียง 1 ชั่วโมง ในการปรับ pH ของสารละลายนี้ ถือว่าเป็นการเสียเวลาไม่มากนัก จึงเลือกวิธีการดังกล่าว (ภาพที่ 16) ในการกำจัดแคลเซียมจากเกลือปลา ซึ่งถือได้ว่าวิธีการกำจัดแคลเซียมที่เลือกนี้เป็น เทคโนโลยี สะอาด (clean technology) เนื่องจากทำการผลิตโดยใช้สารละลายกรดซัลฟูริก ทำให้สารละลายที่เป็น ของเหลือทิ้งจากกระบวนการมีความเป็นกรดลดลง

ตารางที่ 10 pH ของสารละลายภายหลังการกำจัดแคลเซียม และองค์ประกอบทางเคมี (% น้ำหนัก แห้ง) ของเกลือปลากะพงแดงภายหลังการกำจัดแคลเซียมด้วยวิธีเดิมและวิธีใหม่

องค์ประกอบทางเคมี	เกลือปลาเริ่มต้น (ก่อนการกำจัดแคลเซียม)	เกลือปลาหลังการกำจัดแคลเซียม	
		วิธีเดิม	วิธีใหม่
คาร์โบไฮเดรต*	3.11	0.09	0.09
โปรตีน**	47.87 ± 1.22	99.79 ± 0.93	99.73 ± 0.93
ไขมัน	0.01 ± 0.01	0 ± 0.00	0 ± 0.00
เถ้า	49.01 ± 0.01	0.12 ± 0.05	0.18 ± 0.07
pH ของสารละลายภายหลัง การกำจัดแคลเซียม	-	1.78	3.28

หมายเหตุ : ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* คำนวณจาก 100 - (%โปรตีน + %ไขมัน + %เถ้า)

** ใช้ conversion factor ของเจลาติน ซึ่งเท่ากับ 5.55 (Jones, 1931)

2.3 การกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลาชนิด

จากการเลือกวิธีการกำจัดแคลเซียมของเกล็ดปลากระพงแดงในข้อ 2.1 - 2.2 จึงได้นำวิธีการกำจัดแคลเซียมนี้มาลองใช้ในการกำจัดแคลเซียมของเกล็ดปลานิล ซึ่งทำให้องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลานิลเปลี่ยนแปลงไป ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมี (% น้ำหนักแห้ง) ของเกล็ดปลากระพงแดงและเกล็ดปลานิลก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียม

องค์ประกอบทางเคมี	เกล็ดปลากระพงแดง		เกล็ดปลานิล	
	ก่อนกำจัดแคลเซียม	หลังกำจัดแคลเซียม	ก่อนกำจัดแคลเซียม	หลังกำจัดแคลเซียม
คาร์โบไฮเดรต*	3.11	0.09	4.33	3.26
โปรตีน**	47.87 ± 1.22	99.73 ± 0.93	60.01 ± 0.54	96.48 ± 0.99
ไขมัน	0.01 ± 0.01	0 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01
เถ้า	49.01 ± 0.01	0.18 ± 0.07	35.62 ± 0.48	0.26 ± 0.13

หมายเหตุ : ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* คำนวณจาก $100 - (\% \text{โปรตีน} + \% \text{ไขมัน} + \% \text{เถ้า})$

** ใช้ conversion factor ของเจลาติน ซึ่งเท่ากับ 5.55 (Jones, 1931)

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาทั้ง 2 ชนิด ก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียมจะเห็นว่า องค์ประกอบทางเคมีเริ่มต้นของเกล็ดปลานิลมีปริมาณเถ้าน้อยกว่าเกล็ดปลากระพงแดง แต่เมื่อผ่านการกำจัดแคลเซียมแล้วพบว่า ปริมาณเถ้าของเกล็ดปลานิลมีเหลืออยู่มากกว่าเกล็ดปลากระพงแดง อีกทั้งในเกล็ดปลานิลภายหลังการกำจัดแคลเซียมยังมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตคงเหลืออยู่มากกว่า ทำให้สัดส่วนของโปรตีนภายหลังการกำจัดแคลเซียมในเกล็ดปลานิลมีเหลืออยู่น้อยกว่าในเกล็ดปลากระพงแดงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการจัดเรียงตัวขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆภายในโครงสร้างเกล็ดปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทำให้เมื่อนำเกล็ดปลาต่างชนิดมาผ่านการกำจัดแคลเซียมด้วยวิธีเดียวกัน จะทำให้สัดส่วนขององค์ประกอบทางเคมีที่เหลือมีความแตกต่างกันไปบ้างเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามวิธีการกำจัดแคลเซียมที่เลือกนี้สามารถกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลาอื่น (ปลานิล) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยจะเหลือปริมาณเถ้าอยู่ต่ำกว่า 1%

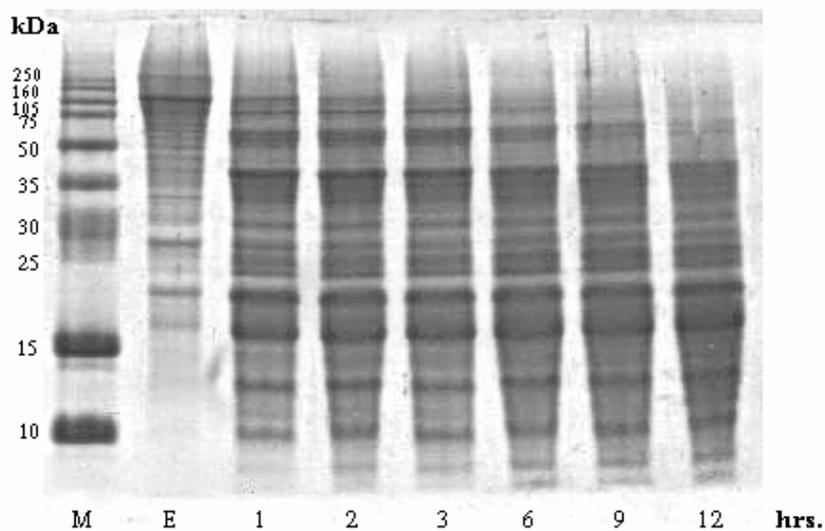
3. การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา

3.1 อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงด้วยกรดร่วมกับความร้อน

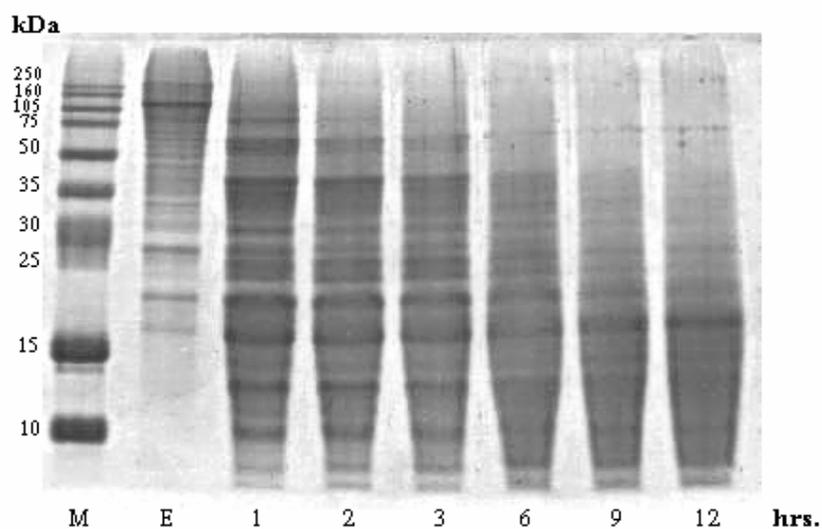
3.1.1 หน่วยย่อยคอลลาเจนของสารสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา (ภาพที่ 13) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การใช้กรดร่วมกับความร้อน ตามด้วยการใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนมีผลต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ในสารสกัดคอลลาเจน ดังภาพที่ 17 กล่าวคือ สารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C (ภาพที่ 17a) และ 90°C (ภาพที่ 17b) เมื่อเวลาการให้ความร้อนนานขึ้น (lane 1-12) โมเลกุลของเปปไทด์ขนาดใหญ่ (> 70 kDa) ในสารสกัดคอลลาเจนจะมีปริมาณลดลง และจะเห็นผลชัดเจนที่อุณหภูมิ 90°C ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนเป็นการเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยกรด (acid hydrolysis) ซึ่งอาจทำให้เกิดฟองตัว กรดและเอนไซม์จึงย่อยสลายคอลลาเจนได้ดีขึ้น ทำให้เกิดเปปไทด์ขนาดเล็ก อีกทั้งเมื่อให้ความร้อนนานขึ้น ทำให้เปปไทด์เกิดการย่อยเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กเพิ่มขึ้นด้วย

เมื่อสังเกตสารสกัดคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียว (ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน) ในภาพที่ 17 (lane E) จะเห็นว่าประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล 50–250 kDa ซึ่งใหญ่กว่าสารสกัดคอลลาเจนที่ได้จากการสกัด 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนตามด้วยการใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน จากการเปรียบเทียบกับคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว (lane D) ในภาพที่ 18 จะเห็นว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 105-250 kDa คือ เปปไทด์ของสาย β , α_1 และ α_2 ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของคอลลาเจน type I ดังนั้นจึงสรุปว่าการสกัดแบบไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนนั้นยังคงรักษาโครงสร้างสามมิติของคอลลาเจนไว้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Nagai *et al.* (2004) ที่กล่าวว่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลาเป็นคอลลาเจน type I ซึ่งประกอบด้วย α_2 2 สาย และ α_1 1 สาย

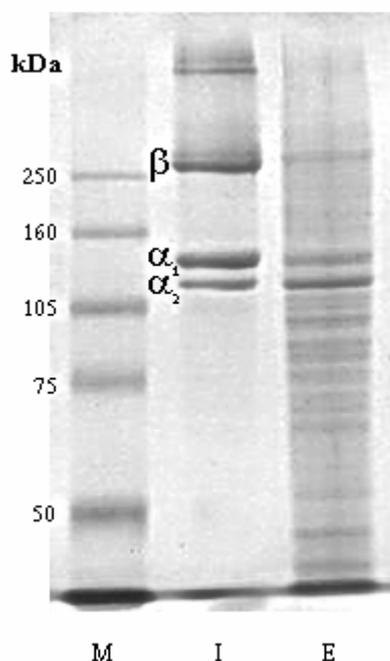


a



b

ภาพที่ 17 ลักษณะบน 16.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดงที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C (a) และ 90°C (b) เป็นเวลา 1-12 ชั่วโมง (lane 1-12) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห้ง ที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารสกัดคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน โดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน (lane E) และ standard marker proteins (lane M)



ภาพที่ 18 ลักษณะบน 7.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อน (lane E) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) และความเข้มข้นเอนไซม์เปปซินเป็น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M) และ คอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว (lane I)

จากผลการทดลองนี้แสดงว่า การให้ความร้อนเกล็ดปลาในกรดอะซิติกก่อนการย่อยด้วยความร้อนเอนไซม์เปปซิน ทำให้เกิดการย่อยโมเลกุลของเปปไทด์ขนาดใหญ่ได้ดีขึ้น ไฮโดรไลเซตที่ได้จึงมีส่วนประกอบของเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเพิ่มมากขึ้น

3.1.2 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดคอลลาเจน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงด้วยวิธี Kjeldahl method พบว่า อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนมีผลต่อปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน ($p \leq 0.05$) อีกทั้งผลรวมของอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนยังมีผลต่อปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน ($p \leq 0.05$) ซึ่ง

ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาโดยไม่ผ่านขั้นตอนการใช้กรดร่วมกับความร้อนจะมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่ได้จากการสกัด 2 ขั้นตอน คือ ใช้กรดร่วมกับความร้อน และการใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ปริมาณโปรตีน (ต่อ 100 กรัม เกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัดคอลลาเจนที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน และสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C และ 90°C เป็นเวลาต่างๆ

เวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน (ชั่วโมง)	ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน	
		75°C	90°C
E ¹	24.93 ± 0.00	-	-
1	-	57.53 ± 0.68 ^a	77.90 ± 0.34 ^{cd}
2	-	66.15 ± 0.00 ^b	78.62 ± 4.07 ^{cde}
3	-	75.74 ± 1.36 ^c	79.34 ± 0.34 ^{de}
6	-	80.54 ± 0.68 ^{def}	80.54 ± 0.00 ^{def}
9	-	81.74 ± 0.33 ^{ef}	85.33 ± 0.00 ^{gh}
12	-	83.35 ± 2.54 ^{fg}	88.82 ± 1.03 ^h

หมายเหตุ : ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a-h} เปรียบเทียบทั้งแนวตั้งและแนวนอน อักษรห้อยที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{1E} หมายถึง สารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาที่ผ่านการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียว

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยที่การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจะเพิ่มขึ้นจาก 57.53% เป็น 83.35% ในชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 12 ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจะเพิ่มขึ้นจาก 77.90% เป็น 88.82% ในชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 12

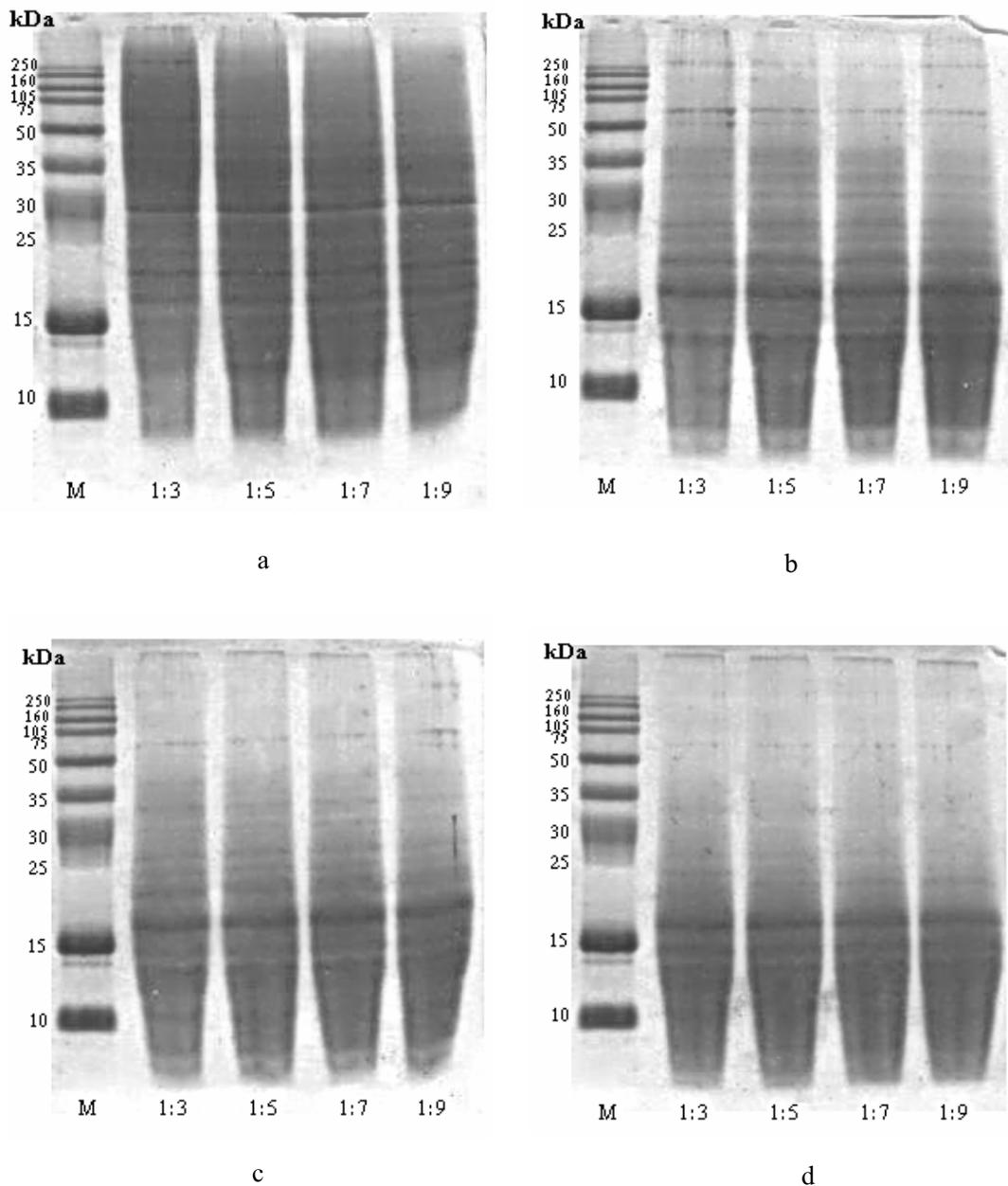
ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการเพิ่มปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C จะมากกว่าอัตราการเพิ่มปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกลือคลอไรด์ที่อยู่ในสารละลายกรดได้รับความร้อนจึงเกิดการฟองตัว ทำให้ง่ายต่อการสกัดโปรตีนคอลลาเจนออกจากโครงสร้างเกลือคลอไรด์ อีกทั้งการให้ความร้อนเป็นเวลานานขึ้น ก็จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนคอลลาเจนออกจากโครงสร้างเกลือคลอไรด์เช่นเดียวกัน ซึ่งจะเห็นได้จากลักษณะเกลือคลอไรด์ที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนจะมีลักษณะที่ฟองหนาขึ้นและฉีกขาดง่าย ซึ่งแตกต่างจากเกลือคลอไรด์ภายหลังจากกำจัดแคลเซียมที่มีลักษณะเหนียวฉีกขาดยาก โดยที่ที่รีทเทนที่ให้มีปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนสูงที่สุด คือ สารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 และ 12 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกวิธีสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง สำหรับสารสกัดคอลลาเจนที่มีเปปไทด์ขนาดโมเลกุลเล็ก (ภาพที่ 17b)

แต่หากต้องการสารสกัดคอลลาเจนที่มีเปปไทด์ขนาดโมเลกุลใหญ่และยังคงรักษาโครงสร้างของสายเปปไทด์ β , α_1 และ α_2 เอไอวี่ (ภาพที่ 18) จะต้องเลือกวิธีสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียว (ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน) แต่ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่ได้จะมีปริมาณน้อย (24.93%) เนื่องจากไม่มีความร้อนช่วยในการฟองตัวของเกลือคลอไรด์ ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนคอลลาเจนต่ำกว่าการสกัดที่ใช้ 2 ขั้นตอน คือ ใช้การสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน

3.2 อัตราส่วนของเกลือต่อกรดอะซิติกและความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซินที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนจากเกลือคลอไรด์กะพงแดง

3.2.1 หน่วยย่อยคอลลาเจนของสารสกัดคอลลาเจน

จากภาพที่ 19 แสดงขนาดของเปปไทด์ที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัดคอลลาเจนจากเกลือคลอไรด์กะพงแดง โดยเปรียบเทียบการสกัดคอลลาเจนจากเกลือคลอไรด์กะพงแดงที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ที่อัตราส่วนระหว่างเกลือคลอไรด์ต่อกรดอะซิติกเป็น 1:3 1:5 1:7 และ 1:9 (w/v) จากนั้นสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินโดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซินเป็น 0% 2.5% 5% และ 10% ของน้ำหนักเกลือคลอไรด์แห้งที่



ภาพที่ 19 ลักษณะบน 16.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรด ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ที่อัตราส่วนระหว่างเกล็ดปลาต่อ กรดอะซิติกเป็น 1:3 1:5 1:7 และ 1:9 (w/v) (lane 1:3 1:5 1:7 และ 1:9) และสกัดด้วยกรด ร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 0% (a) 2.5% (b) 5% (c) และ 10% (d) ของ น้ำหนักเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M)

ผ่านการกำจัดแคลเซียม ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซินมีผลต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ในสารสกัดคอลลาเจน แต่ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดไม่มีผลหรือมีผลไม่เด่นชัดต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ในสารสกัดคอลลาเจน (ภาพที่ 19a – ภาพที่ 19d) เมื่ออัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดเปลี่ยนไปแต่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ แถบของเปปไทด์บน SDS-PAGE จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือการเปลี่ยนแปลงไม่เด่นชัด ขณะที่อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดคงที่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้แถบของเปปไทด์บน SDS-PAGE เปลี่ยนแปลงไป คือ ปรากฏเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เปปซินเป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) ซึ่งจะตัดภายในสายโพลีเปปไทด์ อีกทั้งเปปซินมีความจำเพาะในการย่อยพันธะเปปไทด์ที่ต่อกัน โดยกรดเอมิโนชนิดอโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น phenylalanine, tyrosine และ tryptophan ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์เปปซินคือ เปปไทด์สายยาว (large peptide fragment) และกรดเอมิโนบางส่วน (Devlin, 1997) และจากผลของการลดลงของเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซิน สามารถอธิบายได้จากหลักการทำงานทั่วไปของเอนไซม์ คือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ จะมีผลไปเพิ่มความเร็วของการเกิดปฏิกิริยานั้นๆ ทำให้สามารถเพิ่มความเร็วของการย่อยเปปไทด์ (ปราณี, 2547) ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น เปปไทด์โมเลกุลใหญ่จะมีปริมาณลดลง

3.2.2 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดคอลลาเจน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดง พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซินและอัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกในการสกัดคอลลาเจนมีผลต่อปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน ($p \leq 0.05$) อีกทั้งผลรวมของความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซินและอัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกในการสกัดคอลลาเจนยังมีผลต่อปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน ($p \leq 0.05$) โดยมีความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์ ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ปริมาณกรัมของโปรตีน (ต่อ 100 กรัมเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาที่ผ่านการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:3 1:5 1:7 และ 1:9 (w/v) ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้น 0% 2.5% 5% และ 10% w/w ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อัตราส่วนระหว่าง เกล็ดต่อกรด	ความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซิน (%w/w (น้ำหนักแห้ง))			
	0%	2.5%	5%	10%
1:3	74.54 ± 0.34^{ab}	75.26 ± 0.00^{ab}	76.70 ± 1.36^b	85.57 ± 0.34^c
1:5	81.26 ± 1.01^{cd}	85.09 ± 0.34^c	84.82 ± 0.36^c	85.18 ± 1.05^c
1:7	76.22 ± 2.71^{ab}	75.98 ± 3.05^{ab}	83.41 ± 1.36^{de}	85.81 ± 0.68^c
1:9	73.35 ± 1.36^a	76.46 ± 0.34^b	80.54 ± 0.68^c	85.81 ± 0.00^c

หมายเหตุ : \pm คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a-e} เปรียบเทียบทั้งแนวตั้งและแนวนอน อักษรห้อยที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 13 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซิน ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกรดอะซิติกซึ่งแสดงในค่าอัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติก พบว่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกที่เพิ่มอัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดจาก 1:3 เป็น 1:5 และจะลดลงหรือคงที่ในช่วงหลังที่เพิ่มอัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดจาก 1:5 เป็น 1:9 ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงแรก (อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดเป็น 1:3) ปริมาณกรดมีน้อยเกินไป ทำให้การเกิดปฏิกิริยาเกิดได้ไม่ทั่วถึง และเมื่อเพิ่มปริมาณกรดเป็น 1:5 จึงทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกรดขึ้นไปมากกว่านี้ (1:7 และ 1:9) ปริมาณของเหลวที่มากขึ้นทำให้การสัมผัสหรือการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดหรือเอนไซม์กับเกล็ดปลาลดลง เนื่องจากพื้นที่ในการกระจายตัวเพิ่มขึ้น ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นน้อยลง เป็นเหตุให้ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนลดลง จะเห็นว่าสัดส่วนของกรดอะซิติกต่อเกล็ดปลาที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนจะต้องไม่มากหรือน้อยเกินไป นั่นคือ จะมีสัดส่วนหนึ่งๆที่เหมาะสมกับการสกัด ซึ่งให้ผลการทดลองคล้ายกับการทดลองของนันทพร (2550) ซึ่งศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกรดอะซิติกต่อหนังปลาในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสิวกูด ซึ่งได้ทดลองใช้อัตราส่วนระหว่างกรดต่อหนังปลาเป็น 1:10 1:15 1:20 และ

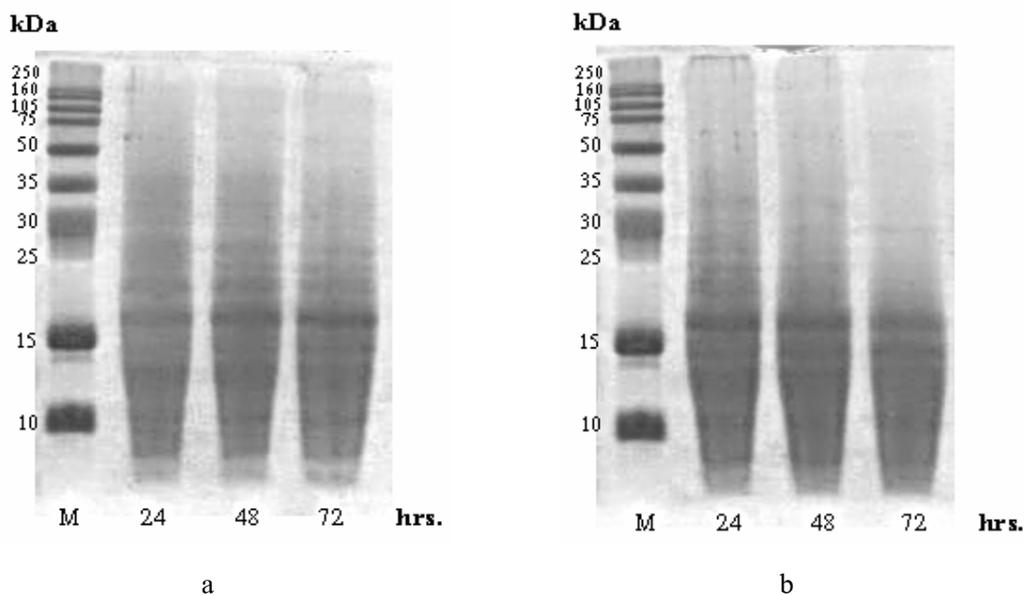
1:25 พบว่าสัดส่วนที่เหมาะสม คือ 1:10 ทั้งนี้เนื่องจากให้ความหนืดที่เหมาะสมต่อการสกัด และได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูง

ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากับ 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม และอัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเท่ากับ 1:5 (w/v) เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ปริมาณเอนไซม์เปปซินและกรดอะซิติกไม่สูงมาก

3.3 อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน

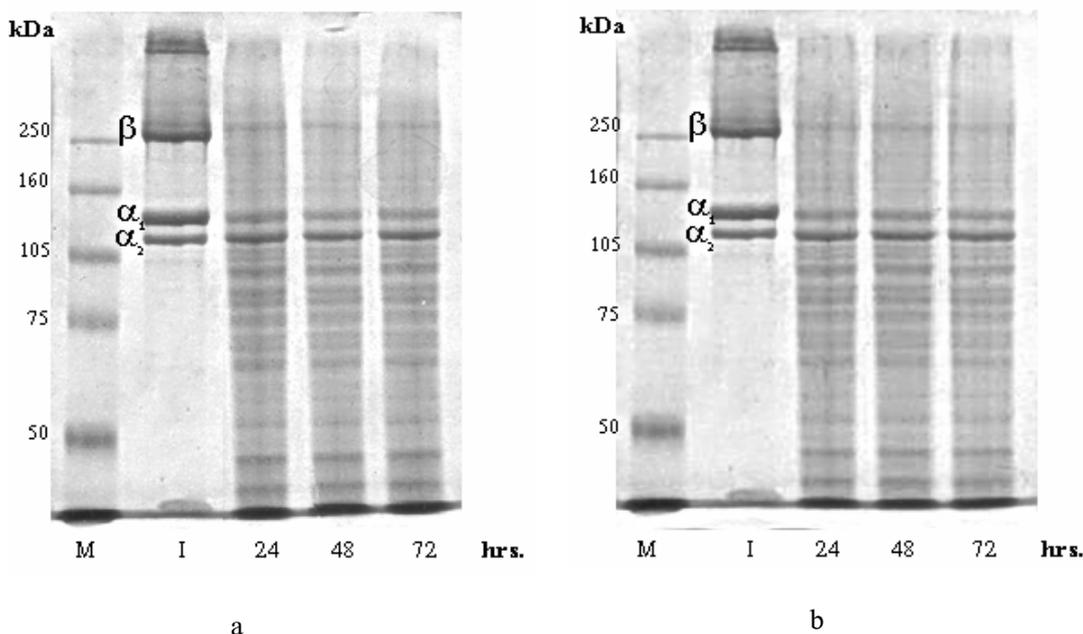
3.3.1 หน่วยย่อยคอลลาเจนของสารสกัดคอลลาเจน

จากภาพที่ 20 แสดงขนาดของเปปไทด์ที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง ซึ่งผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิและเวลาในการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินพบว่า อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน มีผลต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ในสารสกัดคอลลาเจน โดยที่เมื่ออุณหภูมิและเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ในสารสกัดคอลลาเจนจะมีขนาดเล็กลง และที่อุณหภูมิ 37°C (ภาพที่ 20b) จะเห็นผลการลดลงของขนาดโมเลกุลเปปไทด์มากกว่าที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) (ภาพที่ 20a) ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์เปปซิน คือที่อุณหภูมิ 37°C pH 2 (Devlin, 1997)



ภาพที่ 20 ลักษณะบน 16.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดงที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) และสกัดต่อในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนัเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) (a) และอุณหภูมิ 37°C (b) เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (lane 24 48 และ 72) เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M)

จากภาพที่ 21 แสดงขนาดของเปปไทด์ที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดง ทำการสกัดโดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน พบว่าอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินไม่มีผลหรือมีผลไม่เด่นชัดต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ในสารสกัดคอลลาเจน ดังจะเห็นได้ว่าแถบของเปปไทด์บน SDS-PAGE ของการสกัดที่อุณหภูมิ 4°C (ภาพที่ 21a) และ อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) (ภาพที่ 21b) ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกัน โดยประกอบด้วย สายเปปไทด์ β , α_1 , α_2 และเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กอื่นๆ การที่ยังคงสายเปปไทด์ β , α_1 และ α_2 ไว้ได้ เนื่องจากไม่มีการใช้ความร้อนที่เป็นปัจจัยในการเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยกรด



ภาพที่ 21 ลักษณะบน 7.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดงที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อน สกัดเฉพาะขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อน เอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำนักเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ที่อุณหภูมิ 4°C (a) และ อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) (b) เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง (lane 24 48 และ 72) เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M) และคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว (lane I)

3.3.2 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดคอลลาเจน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดง ในการสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง จากนั้นสกัดด้วยความร้อนกับเอนไซม์เปปซิน พบว่าอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนกับเอนไซม์เปปซินมีผลต่อปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน ($p \leq 0.05$) แต่ อุณหภูมิกับเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนกับเอนไซม์เปปซินไม่มีผลร่วมกันต่อปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน ($p > 0.05$) ส่วนการสกัดคอลลาเจนด้วยความร้อนกับเอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียว (ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อน) พบว่า อุณหภูมิในขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนกับเอนไซม์เปปซินไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน ($p >$

0.05) แต่เวลาและผลรวมของอุณหภูมิกับเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินมีผลต่อปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน ($p \leq 0.05$) เมื่อดูผลการทดลองโดยรวม อาจกล่าวได้ว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ปริมาณโปรตีน (ต่อ 100 กรัม เกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านและไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง จากนั้นสกัดต่อด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

เวลาในการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน (ชั่วโมง)	อุณหภูมิในการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน			
	ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน		ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง	
	4°C	อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$)	อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$)	37°C
24	23.74 ± 0.35^a	24.93 ± 0.00^b	85.64 ± 0.00^A	86.62 ± 0.69^{AB}
48	28.14 ± 0.35^d	26.43 ± 0.00^c	86.87 ± 1.04^{AB}	88.58 ± 1.38^B
72	28.14 ± 0.35^d	28.63 ± 0.35^d	88.82 ± 1.73^B	91.76 ± 0.35^C

หมายเหตุ : \pm คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a-d} เปรียบเทียบทั้งแนวตั้งและแนวนอนของการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียว (ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน) อักษรห้อยที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{A-C} เปรียบเทียบทั้งแนวตั้งและแนวนอนของการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน อักษรห้อยที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์ เปปซิน ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจะเพิ่มขึ้นทั้งการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) และ 37°C อีกทั้งปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) เมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 28°C และ 37°C สักคานาน 48 และ 72

ชั่วโมง แต่ในการสกัดที่ชั่วโมงที่ 24 จะยังไม่พบความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาควรให้ความร้อนเกล็ดปลาในสารละลายกรดก่อนจึงนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ โดยทำการย่อยที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ใช้ ซึ่งในการทดลองนี้สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์เปปซิน คือ ที่อุณหภูมิ 37°C และ pH 2 (Devlin, 1997)

ส่วนสารสกัดคอลลาเจนที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน เมื่อสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) พบว่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่เมื่อเพิ่มเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินทั้ง 2 อุณหภูมิ พบว่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากผลการทดลองแสดงว่า เปปซินจะย่อยคอลลาเจนได้น้อยถ้าเกล็ดปลาไม่ผ่านการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จาก 4°C เป็น $28 \pm 2^\circ\text{C}$ จึงไม่เห็นความแตกต่างของการสกัดโปรตีน แต่การให้เวลาในการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนนานขึ้น อาจทำให้เกล็ดปลาฟองตัวเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เปปซินสกัดโปรตีนได้มากขึ้น

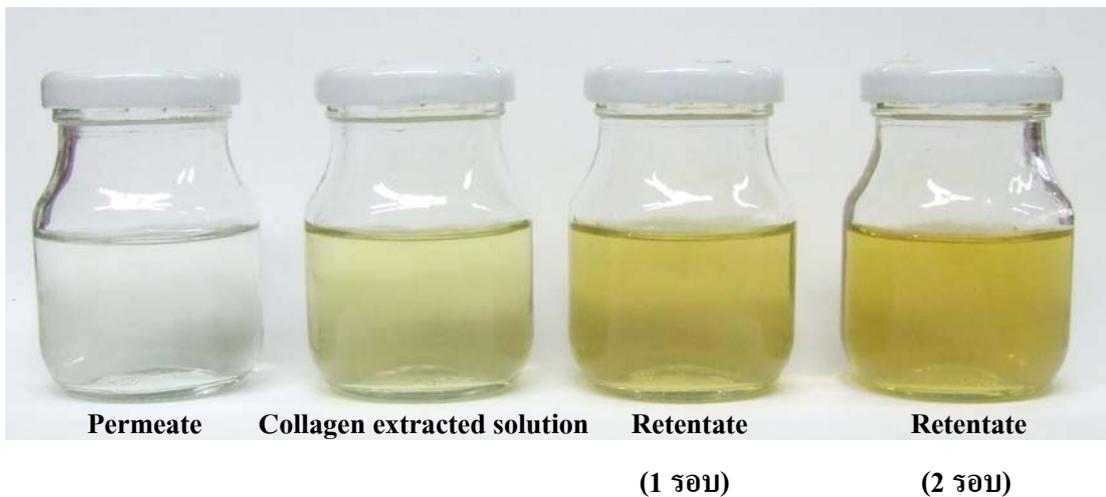
ดังนั้นวิธีที่เลือกใช้ในการสกัดคอลลาเจนในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน คือ การสกัดที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้คอลลาเจนเปปไทด์ขนาดโมเลกุลเล็ก และเลือกการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้คอลลาเจนเปปไทด์ขนาดโมเลกุลใหญ่ ซึ่งให้ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนเป็น 91.76% และ 28.63% ตามลำดับ

จากการทดลองการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาอะพงแดงที่เลือกในข้อที่ 3.1–3.3 จึงเลือกวิธีการสกัดเพื่อให้ได้เปปไทด์โมเลกุลเล็กดังนี้ สกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนการสกัดเพื่อให้ได้เปปไทด์โมเลกุลใหญ่ที่ยังคงส่วนของสายแอลฟา จะสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม และใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

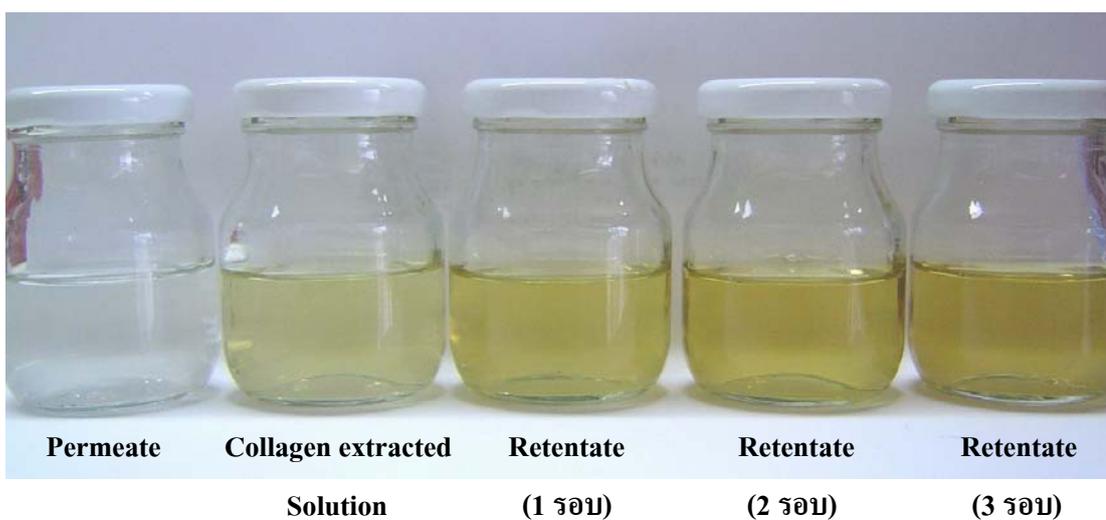
ทำการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลตามวิธีที่ได้จากการศึกษาด้วยเกล็ดปลาอะพงแดง และเปรียบเทียบผลที่ได้จากเกล็ดปลาทั้ง 2 ชนิด ในการศึกษาต่อไป

4. การเพิ่มความเข้มข้นโดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรน

จากการสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากเกล็ดปลากะพงแดงตามขั้นตอนในภาพที่ 13 โดยใช้สภาวะที่เลือกจากข้อที่ 3.1-3.3 (โดยที่ไม่มีการปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น) เนื่องจากสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงที่ได้ก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีปริมาณของแข็งทั้งหมด (% total solid) เท่ากับ 6.71% (ดังตารางที่ 15) ซึ่งถือว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ค่อนข้างต่ำสำหรับการนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยที่ปริมาณของแข็งที่มีอยู่ในสารสกัดคอลลาเจนส่วนใหญ่ คือ โปรตีน ดังนั้นเพื่อให้เป็นการคุ้มค่าทางด้านพลังงาน จึงต้องมีการเพิ่มความเข้มข้นก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรนที่มีความสามารถในการกรองแยกอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa เพื่อต้องการให้มีการสูญเสียเปปไทด์จากสารสกัดคอลลาเจนน้อยที่สุด สารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงที่ผ่านการทำให้เข้มข้นโดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรนจะมีสีเหลืองเข้มข้น (retentate ในภาพที่ 22) ส่วนของสารสกัดที่ผ่านเมมเบรนออกมา (permeate ในภาพที่ 22) จะมีสีค่อนข้างใสกว่าสารสกัดคอลลาเจนเริ่มต้น



a



b

ภาพที่ 22 สารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดงเริ่มต้น (collagen extracted solution), สารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านการทำให้เข้มข้นโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,400 x g เป็นเวลา 60 นาทีต่อรอบ (a) และ 30 นาทีต่อรอบ (b) จำนวน 1-3 รอบ และ permeate จากการหมุนเหวี่ยงสารสกัดคอลลาเจน

จากตารางที่ 15 จะเห็นว่าทำให้เข้มข้น โดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรนจะทำให้สารสกัดคอลลาเจนมีความเข้มข้นสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการหมุนเหวี่ยงรอบละ 30 นาที และ 60 นาที ในจำนวนรอบที่เท่ากัน การหมุนเหวี่ยงในเวลาต่อรอบนานขึ้น จะทำให้เพิ่มความเข้มข้นได้มากกว่า แต่เมื่อระยะเวลารวมทั้งหมดในการหมุนเหวี่ยงที่เท่ากัน (60 นาที) จะเห็นว่าที่การหมุนเหวี่ยงที่ 30 นาทีต่อรอบ จำนวน 2 รอบ จะสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดคอลลาเจนได้มากกว่าการหมุนเหวี่ยงที่ 60 นาทีต่อรอบ จำนวน 1 รอบ และการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรนที่มีความสามารถในการกรองแยกอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa นี้จะทำให้เกิดการสูญเสียส่วนของของแข็งอยู่ในสารสกัดที่ผ่านเมมเบรนเท่ากับ 2.79% จากผลการทดลอง จึงเลือกการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดคอลลาเจนก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรนที่มีความสามารถในการกรองแยกอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa ที่ $2,400 \times g$ เป็นเวลา 30 นาทีต่อรอบ จำนวน 3 รอบ เนื่องจากมีความสามารถในการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดคอลลาเจนได้มากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด โดยปริมาณของแข็งเพิ่มจาก 6.71% เป็น 14.45% และ pH เพิ่มขึ้นจาก 3.30 เป็น 3.52

ตารางที่ 15 ปริมาณของแข็งทั้งหมด (% Total solid) และค่า pH ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงก่อนและหลังการเพิ่มความเข้มข้น โดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรนที่ความเร็ว $2,400 \times g$ เป็นเวลาและจำนวนรอบต่างๆ

ส่วนของสารสกัดคอลลาเจน	เวลาต่อรอบ (นาที)	จำนวนรอบ	เวลารวม (นาที)	% Total solid	pH
เริ่มต้น	-	-	-	6.71 ± 0.25^b	3.30
Retentate	60	1	60	10.89 ± 0.10^d	ND
	60	2	120	14.30 ± 0.03^f	ND
	30	1	30	10.40 ± 0.07^c	3.40
	30	2	60	12.67 ± 0.21^e	3.47
	30	3	90	14.45 ± 0.04^f	3.52
Permeate	-	-	-	2.79 ± 0.00^a	3.37

หมายเหตุ : ND, No data

\pm คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a-f} อักษรห้อยที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

5. คอลลาเจนผง

สกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากเกล็ดปลานิลด้วยวิธีการที่สรุปได้จากการศึกษาการสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากเกล็ดปลากะพงแดง สารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงและสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลที่ผ่านการทำให้เข้มข้นตามวิธีในข้อ 4. นำมาทำแห้งแบบพ่นฝอยตามวิธีของสุปราณี (2539) ได้เป็นคอลลาเจนผง (collagen hydrolysate powder) พบว่าคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลากะพงแดง และคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลานิล จะมีลักษณะปรากฏที่เหมือนกัน คือ เป็นผงสีเหลืองอ่อนเกือบขาว ดังภาพที่ 23



a

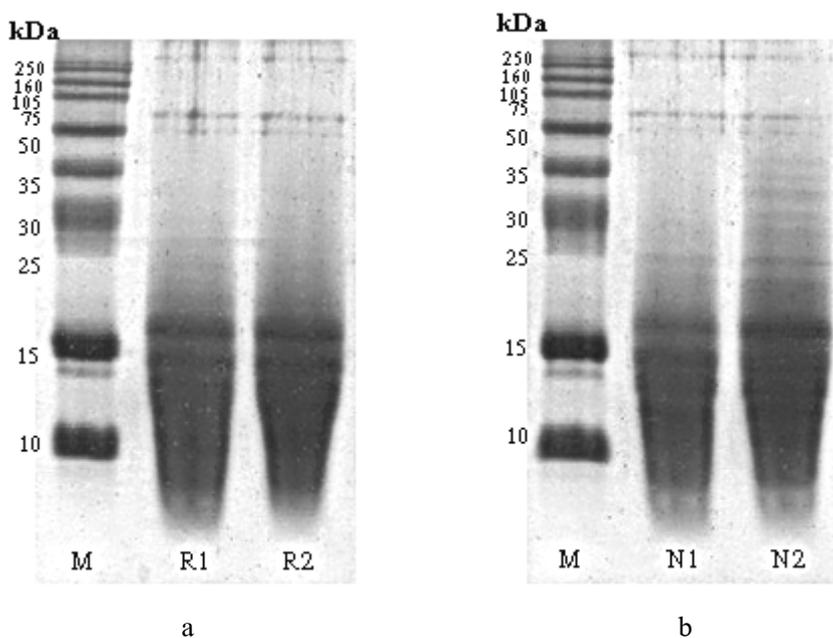


b

ภาพที่ 23 สารสกัดคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลากะพงแดง (a) และสารสกัดคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลานิล (b) ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย

5.1 หน่วยย่อยคอลลาเจน

เมื่อนำสารสกัดคอลลาเจนก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยของเกล็ดปลากระพงแดงและเกล็ดปลานิลมาทำอิเล็กโตรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของแถบเปปไทด์ที่ได้ พบว่าลักษณะของแถบของเปปไทด์ในสารสกัดคอลลาเจนก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยของเกล็ดปลาทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกันหรือแตกต่างกันน้อยมาก ดังภาพที่ 24 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ความร้อนจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยไม่มีผลต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ อีกทั้งการเพิ่มความเข้มข้นโดยหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรนที่มีความสามารถในการกรองแยกอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa มีผลทำให้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa สูญเสียออกไปอยู่ในสารละลายที่ลอดผ่านเมมเบรน ดังจะเห็นจากผลการทดลองในตารางที่ 15 ซึ่งปริมาณของแข็งทั้งหมดในส่วนของสารละลายที่ลอดผ่านเมมเบรนมีค่าอยู่ที่ 2.79%



ภาพที่ 24 ลักษณะบน 16.5% SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดง (a) ก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย (lane R1 และ R2) และสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิล (b) ก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย (lane N1 และ N2) เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M)

5.2 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดคอลลาเจนก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย และปริมาณผลได้ (% yield) ภายหลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย

จากตารางที่ 16 จะเห็นว่าปริมาณ โปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิล เท่ากับ 88.82% ของเกล็ดปลานิลแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง เท่ากับ 91.76% ของเกล็ดปลากะพงแดงแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม การที่สารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดงมีปริมาณ โปรตีนมากกว่าสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิล เนื่องจากปริมาณโปรตีนของเกล็ดปลากะพงแดงที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมแล้วมีมากกว่าปริมาณ โปรตีนของเกล็ดปลานิลที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมแล้ว (ตารางที่ 11) แม้ว่าในเกล็ดปลาเริ่มต้นปริมาณโปรตีนของเกล็ดปลานิลจะมากกว่าเกล็ดปลากะพงแดง (ตารางที่ 6) แต่ในระหว่างการกำจัดแคลเซียม เกล็ดปลานิลมีการสูญเสียปริมาณ โปรตีนออกไปมากกว่าการสูญเสียปริมาณโปรตีนของเกล็ดปลากะพงแดง

ตารางที่ 16 ปริมาณ โปรตีน (ต่อ 100 กรัม เกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัดคอลลาเจนก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย และปริมาณผลได้ (% yield) ภายหลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย

เกล็ดปลา	ปริมาณโปรตีนของสารสกัดคอลลาเจน (% น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณผลได้ (% yield) ของคอลลาเจนผง
เกล็ดปลากะพงแดง	91.76 ± 0.35	85.61
เกล็ดปลานิล	88.82 ± 3.20	81.40

ส่วนปริมาณคอลลาเจนผงที่ได้จากเกล็ดปลาทั้ง 2 ชนิด จะมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย ภายหลังจากทำให้เข้มข้น ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการสูญเสียไปในระหว่างการทำให้เข้มข้น และการทำแห้งแบบพ่นฝอย

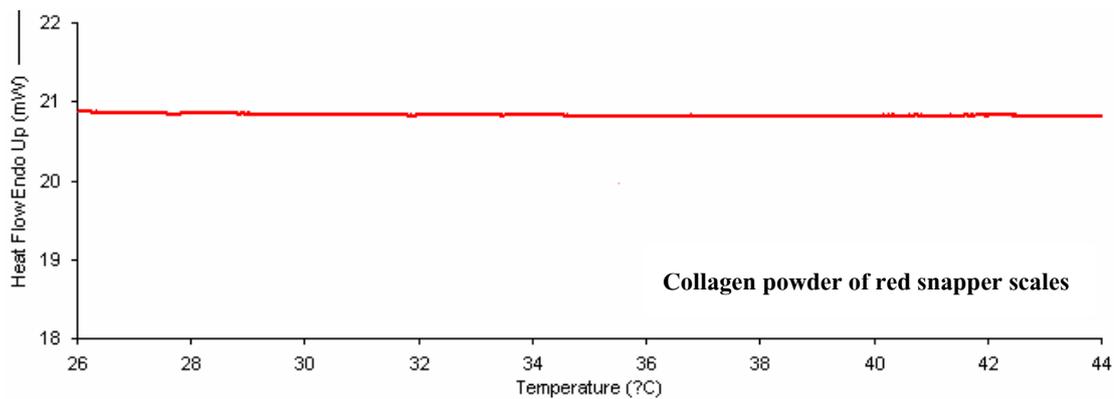
จากตารางที่ 16 โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในคอลลาเจนผงน่าจะเป็นโปรตีนจากคอลลาเจน เนื่องจาก Bailey and Light (1989) ได้กล่าวไว้ว่า โปรตีนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันส่วนใหญ่คือ คอลลาเจน ส่วนโปรตีนชนิดอื่นมีอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นว่าวิธีการสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (คอลลาเจนผง) ที่เลือกนั้น สามารถนำมาใช้ในการสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากเกล็ดปลาชนิดอื่นได้ เช่นเดียวกัน ดังจะเห็นได้จากการสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากเกล็ดปลานิลซึ่งให้ปริมาณผลได้สูงเช่นเดียวกับเกล็ดปลากะพงแดง

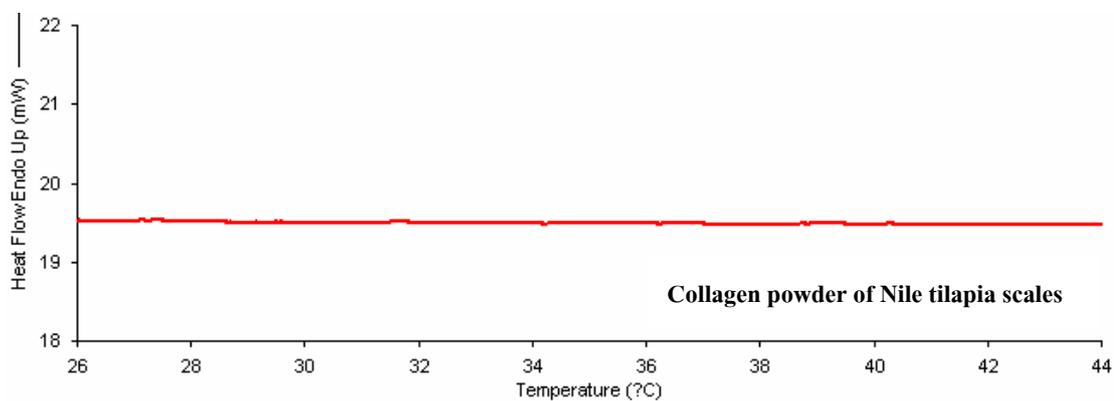
5.3 สมบัติความคงตัวต่อความร้อน

จากการศึกษาสมบัติความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลากะพงแดง และเกล็ดปลานิล จากภาพที่ 25 แสดงลักษณะ DSC thermogram ของสารละลายคอลลาเจนผงในน้ำปราศจากอ็อกซิเจน ซึ่งพบว่าไม่สามารถหาอุณหภูมิการเสียดสภาพได้เนื่องจากไม่ปรากฏ peak ในกราฟ

การที่กราฟจะปรากฏ peak ขึ้นมา ก็เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของระดับพลังงาน ซึ่งได้แก่ การดูดและคายความร้อน ปฏิกริยาที่มีการดูดความร้อน เรียกว่า เอนโดเทอร์มิก (endothermic) ส่วนปฏิกริยาการคายความร้อน เรียกว่า เอกโซเทอร์มิก (exothermic) โดยทั่วไปโปรตีนเมื่อได้รับความร้อนจะมีการดูดความร้อน เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในโมเลกุล นั่นคือมีการทำลายพันธะภายในโมเลกุล ซึ่งพลังงานที่ใช้ในการสลายพันธะจะแสดงเป็นค่าพลังงานเอนทัลปี (enthalpy) (Carr, 1953) ซึ่งทำให้สามารถอธิบายการไม่ปรากฏ peak ในกราฟ (ภาพที่ 25) ได้ เนื่องจากการไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนทัลปีในปริมาณมากพอตลอดเวลาในการให้ความร้อน แสดงว่าเปปไทด์ที่เป็นส่วนประกอบในคอลลาเจนผงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพหรือโมเลกุลของเปปไทด์ไม่เปลี่ยนแปลงตลอดช่วงการเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 1°C ต่อนาที จาก 20°C ถึง 50°C ซึ่งหากความร้อนที่ให้มีผลทำให้คอลลาเจนเสียดสภาพ จะปรากฏการเปลี่ยนแปลงของเอนทัลปีในกราฟ คือ จะไม่เห็นเป็นเส้นตรง แต่จะปรากฏ peak หรืออาจเป็นเพราะคอลลาเจนผง ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดต่างๆจำนวนมาก ทำให้เกิด peak เล็กๆจำนวนมาก แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ตำแหน่งของอุณหภูมิการเสียดสภาพได้



a



b

ภาพที่ 25 DSC thermogram ของสารละลายคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลากะพงแดง (a) และคอลลาเจนผงจากเกล็ดปลานิล (b)

6. คอลลาเจน type I จากเกล็ดปลา

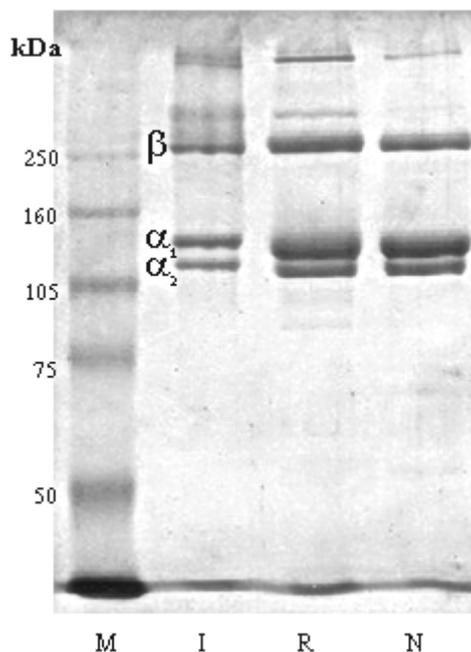
จากการสกัดคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดงและเกล็ดปลานิล โดยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมและใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ที่อุณหภูมิอุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.9 M จากนั้นหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน และนำมาไลซิส ก่อนการทำแห้งแบบระเหิด จะเห็นว่าลักษณะปรากฏของคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดง มีลักษณะที่ขาวกว่าคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล ดังภาพที่ 26 ทั้งนี้เนื่องจากเกล็ดปลาเริ่มต้นมีเม็ดสีแตกต่างกัน โดยที่เกล็ดปลานิลมีส่วนที่เป็นสีดำมากกว่าเกล็ดปลากะพงแดง



ภาพที่ 26 คอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดงและคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล

6.1 หน่วยย่อยคอลลาเจน

จากภาพที่ 27 จะเห็นว่าเมื่อนำคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดงและคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล มาเปรียบเทียบกับคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว พบว่าคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลาทั้ง 2 ชนิด ประกอบด้วยสาย $(\alpha_1)_2\alpha_2$ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nagai *et al.* (2004) ซึ่งกล่าวว่าคอลลาเจนที่ได้จากเกล็ดปลาเป็น คอลลาเจน type I ซึ่งเป็น heterotrimers ที่มีองค์ประกอบของ $(\alpha_1)_2\alpha_2$



ภาพที่ 27 ลักษณะบน 7.5% SDS-PAGE ของคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดง (lane R) และคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล (lane N) เปรียบเทียบกับ standard marker proteins (lane M) และคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว (lane I)

6.2 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดคอลลาเจนก่อนการตกตะกอนแยกคอลลาเจน type I และปริมาณผลได้ (% yield) ภายหลังจากการทำแห้งแบบระเหิด

จากตารางที่ 17 จะเห็นว่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิลเท่ากับ 26.43% ของเกล็ดปลานิลแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดงเท่ากับ 28.63% ของเกล็ดปลากะพงแดงแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม จะเห็นว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดออกจากเกล็ดปลาทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

ส่วนปริมาณผลได้ของคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดงและเกล็ดปลานิล มีค่าเป็น 0.83% และ 0.82% ซึ่งเป็นปริมาณที่ไม่แตกต่างกันนัก แต่เป็นปริมาณผลได้ที่น้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากไม่ได้ทำการสกัดเกล็ดปลาซ้ำ

ตารางที่ 17 ปริมาณโปรตีน (ต่อ 100 กรัม เกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) ในสารสกัด คอลลาเจนก่อนการตกตะกอนแยกคอลลาเจน type I และปริมาณผลได้ (% yield) ภายหลังจากทำแห้งแบบระเหิด

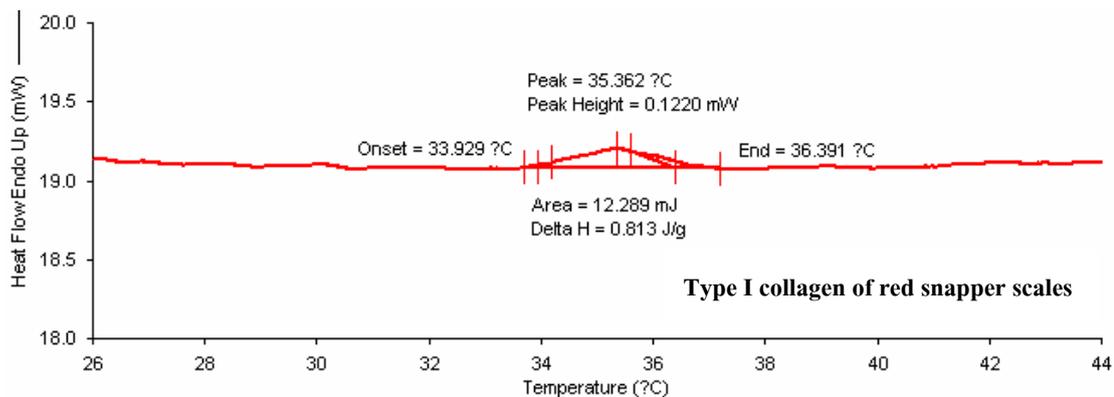
เกล็ดปลา	ปริมาณโปรตีนของสารสกัดคอลลาเจนก่อนการตกตะกอนแยกคอลลาเจน type I (% น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณผลได้ (% yield) ภายหลังจากทำแห้งแบบระเหิด
เกล็ดปลากะพงแดง	28.63 ± 0.35	0.83
เกล็ดปลานิล	26.43 ± 0.35	0.82

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นว่าวิธีการสกัดคอลลาเจน type I ที่เลือกนั้น สามารถนำมาใช้ในการสกัดคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลาชนิดอื่นได้เช่นเดียวกัน ดังจะเห็นได้จากการสกัดคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล ซึ่งให้ปริมาณที่ไม่แตกต่างกันนัก

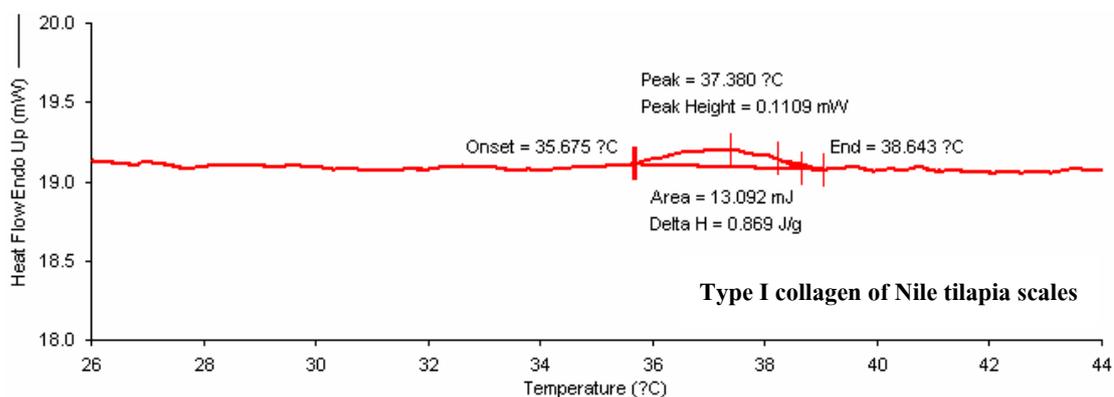
6.3 อุณหภูมิการเสียสภาพ

จากการศึกษาสมบัติความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดงและคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล จากภาพที่ 28 แสดงลักษณะ DSC thermogram ของสารละลายคอลลาเจน type I ในน้ำปราศจากไอออน พบว่าคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดงและคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิลมีค่าอุณหภูมิการเสียสภาพเท่ากับ 35.4°C และ 37.4°C ตามลำดับ

จะเห็นว่าจากกราฟจะปรากฏ peak ซึ่งแสดงอุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด (peak maximum temperature) หรืออุณหภูมิการเสียสภาพ (denaturation temperature) นั่นคืออุณหภูมิที่โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป 50% (Kilara and Harwalkar, 1996) ซึ่งการที่อุณหภูมิการเสียสภาพของคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลาทั้งสองชนิดมีค่าที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากการที่คอลลาเจน type I ในเกล็ดปลาแต่ละชนิดมีส่วนของกรดอะมิโน (โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน) ที่แตกต่างกัน (Bailey and Light, 1989) โดยอาจคาดคะเนได้ว่าปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิลมีปริมาณสูงกว่าปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดง



a



b

ภาพที่ 28 DSC thermogram ของสารละลายคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดง (a) และคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล (b)

หมายเหตุ onset temperature: T_o คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่มีการดูดกลืนความร้อนในการเสียดสภาพ
peak maximum temperature: T_p คือ อุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด
recovery or end temperature: T_r คือ อุณหภูมิสุดท้ายในการดูดกลืนความร้อน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. องค์ประกอบหลักของเกล็ดปลา คือ โปรตีนและเถ้า (สารอนินทรีย์) เนื่องจากโครงสร้างของเกล็ดปลา ประกอบด้วย extracellular matrix ที่มีคอลลาเจน type I และ calcium-deficient hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลากะพงแดง ได้แก่ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและเวลาในการแช่เกล็ดปลา ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดแคลเซียม คือ แช่เกล็ดปลากะพงแดงในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่นำกลับมาใช้ใหม่ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาแช่ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.2 N เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมด้วยวิธีนี้จะมีปริมาณเถ้าเหลืออยู่ต่ำกว่า 1% (น้ำหนักแห้ง) และสารละลายสุดท้ายมี pH ประมาณ 3-4

3. ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์และปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน ได้แก่ อุณหภูมิและเวลาในกระบวนการให้ความร้อน, ความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซิน, อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติก, อุณหภูมิและเวลาในการสกัดคอลลาเจน ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนที่มีขนาดเปปไทด์เล็ก (คอลลาเจนไฮโดรไลเซต) คือ การสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ตามด้วยการสกัด ที่อุณหภูมิห้อง 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม ซึ่งทำให้ได้ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนสูงถึงประมาณ 90% ของเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม จากนั้นทำการเพิ่มความเข้มข้นโดยการหมุนเหวี่ยงผ่านเมมเบรนขนาด 3 kDa ที่ความเร็ว 2,400 x g เป็นเวลา 30 นาทีต่อรอบ จำนวน 3 รอบ ก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

ลักษณะคอลลาเจนผงที่ได้จะมีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 25 kDa และไม่ปรากฏอุณหภูมิการเสียสภาพของคอลลาเจนผง เมื่อละลายในน้ำที่ปราศจากอ็อกซิเจน และให้ความร้อนจาก 20-50°C ด้วยอัตราการให้ความร้อน เท่ากับ 1°C ต่อนาที

4. สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนที่มีขนาดเปปไทด์ใหญ่ (คอลลาเจน type I) คือ การสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 2.5% ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกล็ดต่อกรดอะซิติกเป็น 1:5 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนประมาณ 25% ของเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม จากนั้นนำมาแยกคอลลาเจน typ I โดยการตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.9 M ที่ไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ $20,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ตะกอนที่ได้ละลายในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M แล้วนำไปไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4°C สุดท้ายนำไปทำแห้งแบบระเหิด

ลักษณะคอลลาเจน type I ที่ได้จะประกอบด้วยสาย $(\alpha_1)_2\alpha_2$ ส่วนอุณหภูมิการเสีสภาพของคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลากะพงแดง (35.4°C) มีค่าต่ำกว่าคอลลาเจน type I จากเกล็ดปลานิล (37.4°C)

5. สภาวะการสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเซตและการสกัดคอลลาเจน type I ที่เลือกได้ การศึกษาสภาวะการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง สามารถนำไปใช้ได้กับเกล็ดปลาชนิดอื่นๆ โดยที่ให้ปริมาณผลได้ที่ใกล้เคียงกัน

6. สภาวะในการผลิตคอลลาเจนมีความสำคัญต่อลักษณะของคอลลาเจนที่ผลิต ซึ่งลักษณะของคอลลาเจนที่แตกต่างกันจะเหมาะสมต่อการใช้งานที่แตกต่างกัน เช่น คอลลาเจนที่ยังคงรักษาโครงสร้างสามมิติจะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านเครื่องสำอาง ด้านการแพทย์ และด้านเภสัชกรรม ส่วนคอลลาเจนที่ผ่านการย่อยสลายให้มีขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น คอลลาเจนไฮโดรไลเซตและเจลาติน จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านอาหาร และด้านการแพทย์

ข้อเสนอแนะ

1. คอลลาเจนผงที่สกัดได้มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 25 kDa ซึ่งหากใช้เอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียวในการสกัด ขนาดโมเลกุลของเปปไทด์จะเหลือเปปไทด์ขนาดโมเลกุลใหญ่ ดังนั้นหากต้องการให้ขนาดโมเลกุลของเปปไทด์มีขนาดเล็ก น่าจะทำการย่อยโดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ที่มีความจำเพาะในการย่อยแตกต่างกัน เพื่อเพิ่มความสามารถในการตัดพันธะของเปปไทด์ หรือลดขนาดเปปไทด์โดยใช้กรดร่วมกับความร้อน

2. คอลลาเจน type I ที่ได้จากเกล็ดปลามีปริมาณต่ำมาก จึงควรนำเกล็ดปลาภายหลังการสกัดคอลลาเจน type I กลับมาสกัดซ้ำ เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณผลได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จงจิตร ชินกนกรัตน์. ม.ป.ป. ออกแบบตกแต่งเคลือบปลา. **KU Electronic Magazine**. แหล่งที่มา: <http://www.ku.ac.th/e-magazine/september43/fish/>. 15 ธันวาคม 2548.

จิรพงษ์ (นามแฝง). ม.ป.ป. สารความรู้เรื่องอาหารเสริม 2: คอลลาเจนไฮโดรไลเซท. **Health Concious**. แหล่งที่มา: <http://www.health-concious.com/article.php?id=5293&lang=th>. 16 ตุลาคม 2550.

นันทพร อักนิจ. 2550. การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิรนาม. ม.ป.ป. ทำดอกไม้ประดิษฐ์จากเคลือบปลา. กรมการจัดหางาน. แหล่งที่มา: <http://www.doe.go.th/vg/career/career4/job076.htm>. 15 ธันวาคม 2548.

นิตา เลหาพจนารถ. 2547. Collagen hydrolysate. เครือข่ายความร่วมมือบริการเภสัชสนเทศ. แหล่งที่มา: <http://drug.pharmacy.psu.ac.th/Question.asp?ID=3897&gid=7>. 16 ตุลาคม 2550.

บัญชา พนเจริญสวัสดิ์, วิไลวรรณ ภูล่อ, รัตนา เพ็ญชุนุต, กอบศิริ วรศรี, รันปรี ชิงห์ และกนก พจน์ อารีกุล. 2537. คู่มือปฏิบัติการฟิสิกส์ I. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2524. ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. ม.ป.ป. ไมโครมิเตอร์.

ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. แหล่งที่มา:

<http://203.158.100.100/physics/oldfront/71/3/measurement1.htm#micro>. 5 ธันวาคม 2549.

มีทนา แสงจินดาวงษ์. 2545. **ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มาลัยวรรณ อารยะสกุล และ วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร. 2549. เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์, น. 300-333. ใน ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, ผู้รวบรวม. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 5. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2550 ก. ปลากระพงแดง. วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. แหล่งที่มา:

<http://th.wikipedia.org/wiki/ปลากระพงแดง>, 15 กันยายน 2550.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2550 ข. ปลานิล. วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. แหล่งที่มา:

<http://th.wikipedia.org/wiki/ปลานิล>, 21 พฤศจิกายน 2550.

วิมล เหมาะะจันทร์. 2540. **ชีววิทยาปลา**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุปราณี เข้มพราย. 2539. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิเพื่อใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภาพร สุกสีเหลือง. 2542. **มินวิทยา (Ichthyology)**. ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.

อัมพร ภิญโญวิทย์. 2545. **มินวิทยา (Ichthyology)**. พิมพ์ครั้งที่ 1. พิมพ์ที่: โรงพิมพ์บริษัท ต้นฉบับ จำกัด, จันทบุรี.

AOAC. 2000. **Official Method of Analysis, 17 ed.** Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.

Anonymous. n.d. **The freshwater institute of Gyeonggi.** Available source: <http://fish.gyeonggi.go.kr/fishs/fishs2.php>. November 12, 2006.

Bailey, A.J. and N.D. Light. 1989. **Connective Tissue in Meat and Meat Product.** Elsevier Sciences Publishers, London.

Balian, G. and J.H. Bowes. 1977. The structure and properties of collagen, pp.1-31. *In* A.G. Ward and A. Courts. eds. **The Science and Technology of Gelatin.** Academic Press, Inc., London.

Bendall, J.R. 1964. Meat proteins, pp. 225-254. *In* H.W. Schultz, ed. **Symposium on foods: protein and their reactions.** The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.

Creighton, T. E. 1993. **Protein : Structures and Molecular Properties.** W. H. Freeman and Company, New York.

Currey, J.D. and K. Brear. 1990. Hardness, Young's modulus and yield stress in mammalian mineralized tissues. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** 1: 14–20.

Da'valos, A., M. Miguel, B. Bartolome' and R. Lo'pez-Fandiño. 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **J. Food Prot.** 67: 1939–1944.

Devlin, T.M. 1997. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations.** 4th ed. Wiley-Liss, Inc., New York.

- Fahmi A., S. Morimura, H.C. Guo, T. Shigematsu, K. Kida, Y. Uemura. 2004. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. **Process Biochem.** 39: 1195–1200.
- Finkelstein, I., G.E. Trope, J.G. Heathcote, D.S. Rootman, L. Spero and I.A. Menon. 1991. Further evaluation of collagen shields as a delivery sytem for 5-fluoruracil: histopathological observations. **Can. J. Ophthalmol.** 26: 129–132.
- Foegeding, E.A., T.C. Lanier and H.O. Hultin. 1996. Characteristics of Edible Muscle Tissues, pp. 879-942. *In* O.R. Fennema, ed. **Food Chemistry.** Marcel Dekker, Inc., New York.
- Friess, W. 1998. Collagen – biomaterial for drug delivery. **Eur. J. Phar. and Biophar.** 45: 113-136.
- Fujita H., M. Yoshikawa. 1999. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. **Immunopharmacology.** 44: 123–127.
- Ikoma, T.,H. Kobayashi, J. Tanaka, D. Walsh, and S. Mann. 2003 a. Microstructure, mechanical, and biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. **J. Struct. Biol.** 142: 327–333.
- Ikoma, T., H. Kobayashi, J. Tanaka, D. Walsh and S. Mann. 2003 b. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. **Int. J. Biol Macromol.** 32: 199–204.
- Jones, D.B. 1931. Factors for Converting Percentages of Nitrogen in Foods and Feeds into Percentages of Proteins. **Circular No. 183.** United States Department of Agriculture. Washington D.C.
- Kilara, A. and V.R. Harwalkar. 1996. Denaturation, pp. 71-165. *In* S. Nakai and H.W. Modler, eds. **Food Protein Properties and Characterization.** Wiley-VCH Inc., New York.

- Kimura, S., Y. Miyauchi, and N. Uchida. 1991. Scale and bone type I collagens of carp (*Cyprinus carpio*). **Comp. Biochem. Physiol.** 99B: 473–476.
- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai and M. Tanaka. 2005. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chem.** 89: 363–372.
- Kosmahl, E. M. n.d. TENDON, LIGAMENT, SKIN FIBER PICTURE. **University of Scranton - Department of Physical Therapy**. Available source: <http://academic.uofs.edu/faculty/kosmahle1/courses/pt245/fiberc.htm>. June 13, 2006.
- Kucharz, E. J. 1992. **The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology**. Springer-Verlage, Berlin. 7-29.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.
- Lee, C.H., A. Singla and Y. Lee. 2001. Biomedical applications of collagen. **Int. J. Pharm.** 221: 1–22.
- Li, B., F. Chen, X. Wang, B. Ji and Y. Wu. 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. **Food Chem.** 102: 1135-1143.
- Maleeratmongkun, T. 2006. **Physicochemical properties of collagen extracted from skin and scale of giant gouramy (*Osphronemus guramy*) and proliferative response of human dermal fibroblast cell culture to the extracted collagen**. M.S. thesis, Chulalongkorn University.

- Mann, S. 2001. **Biom mineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry**. Oxford University Press, New York.
- Minabe, M., K. Takeuchi, K. Tamura, T. Hori and T. Umemoto. 1989. Subgingival administration of tetracycline on a collagen film. **J. Periodontol.** 60: 552–556.
- Mora-Gutierrez, A., H.M. Farrell Jr, R. Attaie, V.J. McWhinney and C. Wang. 2007. Effects of bovine and caprine Monterey Jack cheeses fortified with milk calcium on bone mineralization in rats. **Int. Dairy J.** 17: 255–267.
- Morimura, S., H. Nagata, Y. Uemura, A. Fahmi, T. Shigematsu and K. Kida. 2002. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochem.** 37: 1403–1412.
- Moskowitz, R.W. 2000. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Semin. Arthritis Rheum.** 30: 87-99.
- Murata, M., F. Maki, D. Sato, T. Shibata and M. Arisue. 2000. Bone augmentation by onlay implant using recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat skull without periosteum. **Clin. Oral Implants Res.** 11: 289–295.
- Nagai, T. and N. Suzuki. 2000. Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins. **Food Chem.** 68: 277-281.
- Nagai, T., M. Izumi, and M. Ishii. 2004. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. **Int. J. Food Sci. Technol.** 39: 239–244.
- Nomura, Y., H. Sakai, Y. Ishii, and K. Shirai. 1996. Preparation and some properties of type I collagen from fish scales. **Biosci. Biotech. Biochem.** 60: 2092–2094.

- Ogawa, M., R.J. Portier, M.W. Moody, J. Bell, M.A. Schexnayder and J.N. Losso. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). **Food Chem.** 88: 495-501.
- Olsen, D., C. Yang, M. Bodo, R. Chang, S. Leigh, J. Baez, D. Carmichael, M. Perälä, E. Hämäläinen, M. Jarvinen and J. Polarek. 2003. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. **Adv. Drug Delivery Reviews.** 55: 1547– 1567.
- Piez, K.A. 1985. **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering.** Wiley, New York. 699-727.
- Poppe, J. 1992. Gelatin, pp. 99-123. In A. Imeson, ed. **Thickening and Gelling Agents for Food.** Blackie Academic & Professional, London.
- Sadowska, M., I. Kolodziejska and C. Niecikowska. 2003. Isolation of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chem.** 81: 257-262.
- Sato, H., H. Kitazawa, I. Adachi, I. Horikoshi. 1996. Microdialysis assessment of microfibrillar collagen containing a p-glycoprotein-mediated transport inhibitor, cyclosporine A, for local delivery of etoposide. **Pharm. Res.** 13: 1565–1569.
- Schunck, M., C.H. Schulze and S. Oesser. 2007. P189 Collagen hydrolysate supplementation stimulates proteoglycan metabolism and gene expression of articular chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage.** 15: B136 p.
- Slendernight (pseud.). 2001. Pilot study of the effect of a collagen hydrolysate supplement, Slendernight, on inch and weight loss. **Bodystat changing attitudes to health.** Available source: <http://bodystat.com/Val%2019.pdf>. October 16, 2007.

- Swan, J. E. and P. J. Torley. 1991. **Collagen: Structure, Function and Uses**. Meat Research Institute of New Zealand.
- Verbenas, H. H. W. and L. Alma. 1958. A Quantitative Study of Decalcification Methods in Histology. **J. Clin. Pathol.** 11: 229-236.
- Venus (pseud.). 2002. Collagen collection: pure hydrolyzed collagen may help joint maintenance and skin health. **Health4youonline**. Available source:
http://www.health4youonline.com/health_supplements_collagen_collection_ms36.htm.
October 16, 2007.
- Ward, A. G. and A. Courts. 1977. **The Science and Technology of Gelatin**. Academic Press, Inc., London.
- Waszkowiak, K. and W. Dolata. 2007. The application of collagen preparation as carriers of rosemary extract in the production of processed meat. **Meat Sci.** 75: 178-183.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ก1 ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณองค์ประกอบทางเคมี (% น้ำหนักแห้ง) ของเกลือปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและเวลาในการแช่ต่างๆกัน

Variables	SOV	df	SS	MS	F-Value
Ash	Time	1	0.773	0.773	9.429*
	HCl conc.	3	5468.826	1822.942	22236.812**
	Time * HCl conc.	3	0.694	0.231	2.821 ^{ns}
	Error	7	0.574	0.082	
	Total	15	11498.034		
Protein	Time	1	1.609	1.609	2.548 ^{ns}
	HCl conc.	3	8688.418	2896.139	4587.443**
	Time * HCl conc.	3	1.618	0.539	0.854 ^{ns}
	Error	15	9.470	0.631	
	Total	23	146416.933		

หมายเหตุ^{ns} = Not significantly different at the confidence intervals of 95% ($p > 0.05$)

* = Significantly different at the confidence intervals of 95% ($p \leq 0.05$)

** = Highly significantly different at the confidence intervals of 99% ($p \leq 0.01$)

ตารางผนวกที่ ก2 ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบความหนา (มิลลิเมตร) ของเกล็ดปลาที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและเวลาในการแช่ต่าง ๆ กัน

SOV	df	SS	MS	F-Value
Time	1	0.000	0.000	0.001 ^{ns}
HCl conc.	3	3.220	1.073	108.812**
Time * HCl conc.	3	0.023	0.008	0.769 ^{ns}
Error	392	3.866	0.010	
Total	400	48.992		

หมายเหตุ^{ns} = Not significantly different at the confidence intervals of 95% ($p > 0.05$)

* = Significantly different at the confidence intervals of 95% ($p \leq 0.05$)

** = Highly significantly different at the confidence intervals of 99% ($p \leq 0.01$)

ตารางผนวกที่ ก3 ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน

SOV	df	SS	MS	F-Value
Temp.	1	345.042	345.042	152.200**
Time	5	959.929	191.986	84.686**
Temp. * Time	5	281.146	56.229	24.803**
Error	12	27.204	2.267	
Total	24	147504.548		

หมายเหตุ^{ns} = Not significantly different at the confidence intervals of 95% ($p > 0.05$)

* = Significantly different at the confidence intervals of 95% ($p \leq 0.05$)

** = Highly significantly different at the confidence intervals of 99% ($p \leq 0.01$)

ตารางผนวกที่ ก4 ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่สกัดโดยใช้อัตราส่วนระหว่างเกลือต่อกรดและความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซินต่างๆ

SOV	df	SS	MS	F-Value
Enzyme conc.	3	393.717	131.239	81.201**
Ratio (acid:scale)	3	168.789	56.263	34.812**
Enzyme conc. * Ratio	9	109.712	12.190	7.542**
Error	16	25.859	1.616	
Total	32	207416.146		

หมายเหตุ^{ns} = Not significantly different at the confidence intervals of 95% ($p > 0.05$)

* = Significantly different at the confidence intervals of 95% ($p \leq 0.05$)

** = Highly significantly different at the confidence intervals of 99% ($p \leq 0.01$)

ตารางผนวกที่ ก5 ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินเพียงขั้นตอนเดียวที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆกัน

SOV	df	SS	MS	F-Value
Temp.	1	0.000	0.000	0.002 ^{ns}
Time	2	35.052	17.526	218.986**
Temp. * Time	2	4.575	2.288	28.582**
Error	6	0.480	0.080	
Total	12	8572.374		

หมายเหตุ^{ns} = Not significantly different at the confidence intervals of 95% ($p > 0.05$)

* = Significantly different at the confidence intervals of 95% ($p \leq 0.05$)

** = Highly significantly different at the confidence intervals of 99% ($p \leq 0.01$)

ตารางผนวกที่ ก6 ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆกัน

SOV	df	SS	MS	F-Value
Temp.	1	10.547	10.547	9.648*
Time	2	35.207	17.603	16.104*
Temp. * Time	2	1.952	0.976	0.893 ^{ns}
Error	6	6.559	1.093	
Total	12	93079.089		

หมายเหตุ ^{ns} = Not significantly different at the confidence intervals of 95% ($p > 0.05$)

* = Significantly different at the confidence intervals of 95% ($p \leq 0.05$)

** = Highly significantly different at the confidence intervals of 99% ($p \leq 0.01$)

ตารางผนวกที่ ก7 ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณของแข็งทั้งหมดในสารสกัดคอลลาเจนที่ผ่านการเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีต่างๆ

SOV	df	SS	MS	F-Value
Between Groups	6	229.207	38.201	1632.066**
Within Groups	8	0.187	0.023	
Total	14	229.394		

หมายเหตุ ^{ns} = Not significantly different at the confidence intervals of 95% ($p > 0.05$)

* = Significantly different at the confidence intervals of 95% ($p \leq 0.05$)

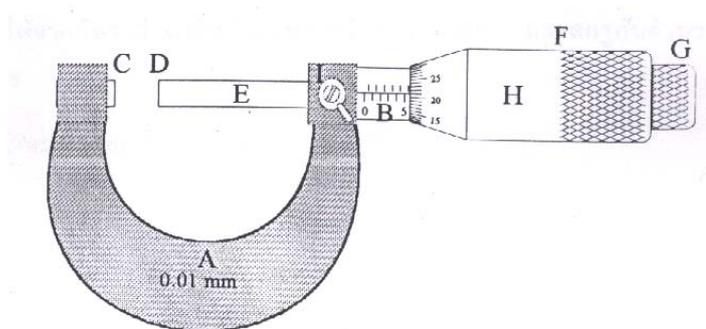
** = Highly significantly different at the confidence intervals of 99% ($p \leq 0.01$)

ภาคผนวก ข
การใช้ไมโครมิเตอร์

ภาคผนวก ข

การใช้ไมโครมิเตอร์

ไมโครมิเตอร์ (Micrometer) เป็นเครื่องมือวัดขนาดของวัตถุที่ต้องการความละเอียดสูงในระดับทศนิยม 3 ตำแหน่งของมิลลิเมตร เครื่องมือวัดชนิดนี้อาศัยหลักการ การเคลื่อนที่ของสกรู ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญ ดังแสดงในภาพผนวกที่ ข1



ภาพผนวกที่ ข1 ส่วนประกอบของไมโครมิเตอร์

ที่มา: บัญชา และคณะ (2537)

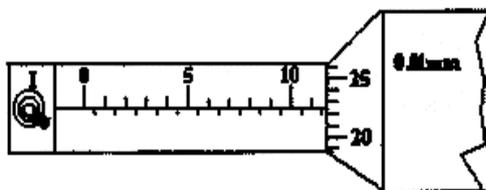
โครง A	มีลักษณะคล้ายคันธนูหรือตะขอเกี่ยว โครง A นี้มีปากวัด C และสเกลนอน B ติดอยู่
แกนสเกลนอน B	แบ่งสเกลเป็นมิลลิเมตร และด้านบนมีขีดบอกระยะครึ่งมิลลิเมตรกำกับอยู่ทุกช่อง สเกลนี้ถือเป็นสเกลหลัก
แกนวัด E	ติดกับปลอกวัด F และปุ่ม G เมื่อหมุนปุ่ม G ทั้งแกนวัด E ปลอกวัด F และปุ่ม G จะเคลื่อนที่ไปบน โครง A
ปากวัด D	เป็นส่วนปลายสุดของแกนวัด ปากวัด D และ C เป็นผิวราบเกลี้ยงตัดตรง สำหรับใช้หนีบวัตถุที่ต้องการวัดขนาด
สเกลวงกลม H	อยู่ตรงขอบโดยรอบปลอกวัด แบ่งเป็นช่องกว้างเท่าๆกัน มีทั้งหมด 50 ช่อง ($n = 50$)
ปุ่ม G	ใช้หมุนเพื่อนำปาก D ไปสัมผัสกับผิววัตถุ ซึ่งนำมาไว้ระหว่างปากวัด C-D ภายในปุ่ม G มีสปริงเพื่อรับแรงกด เมื่อปาก

วัด D สัมผัสพอดีกับวัตถุ จะมีเสียงดังกรีกเบาๆ แสดงว่า สปริงรับแรงกดพอดีแกนวัดจะไม่เดินหน้าอีกต่อไป เราก็จะอ่านค่าจากสเกลได้

ปุ่ม I ใช้ตรึงแกนวัด ปลอกวัด และปุ่ม G ให้ติดกับโครง A ทำให้สเกลไม่เลื่อนตำแหน่งขณะอ่าน เวลาใช้จะต้องบิดไปทางซ้ายสุด

วิธีการใช้ไมโครมิเตอร์: หมุนแกน G ให้แกนวัดถอยหลัง เพื่อให้ปาก C-D เปิดกว้างกว่าขนาดของวัตถุเล็กน้อย แล้วนำวัตถุที่จะวัดขนาดไปไว้ระหว่างปาก C-D ให้ด้านหนึ่งชิดปากวัด C ไว้ แล้วหมุนแกน G ให้ปากวัด D มาสัมผัสพอดีกับผิวด้านหนึ่งของวัตถุ โดยสังเกตจากเสียงกรีกเบาๆ จากนั้นให้บิดปุ่ม I ไปทางซ้ายเพื่อตรึงแกนวัดไว้ แล้วอ่านค่าการวัดได้

การอ่านค่าการวัดบนสเกลไมโครมิเตอร์: เมื่อวัดขนาดของวัตถุอันหนึ่ง ดังแสดงในภาพผนวกที่ ข2 โดยที่ Least Count ของไมโครมิเตอร์ = 0.010 mm. (ถ้าหมุนแกนวัดถอยหลังไปเพียง 1 ช่อง ปากวัด C-D จะห่างกันเป็นระยะทาง $0.5/50 = 0.010$ mm. ซึ่งเป็นค่าน้อยที่สุดที่สามารถอ่านได้จากเครื่องวัดชนิดนี้ เรียกว่า Least Count โดยปกติค่า Least Count ของไมโครมิเตอร์ จะเขียนไว้บนโครง A)



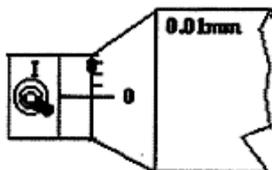
ภาพผนวกที่ ข2 ตัวอย่างสเกลบนไมโครมิเตอร์ที่วัดได้

ที่มา: ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล, ม.ป.ป.

1. ขณะนี้ขอบของสเกลวงกลมอยู่ที่ตำแหน่ง 11.500 มิลลิเมตร เลยออกมาเล็กน้อยบนสเกลหลัก
2. จี๊ดที่ 22.5 ของสเกลวงกลมตรงกับแกนนอนบนสเกลหลัก แล้วเอาตัวเลข 22.5 นี้คูณกับค่า Least Count จะได้เป็นค่าเศษของมิลลิเมตร เป็น $22.5 \times 0.010 = 0.225$ mm.
3. นำค่าที่ได้จากข้อ 1. และข้อ 2. รวมกัน จะได้เป็นผลการวัดครั้งนี้ นั่นคือ

$$\text{ผลการวัด} = 11.500 \text{ mm.} + 0.225 \text{ mm.} = 11.725 \text{ mm.}$$

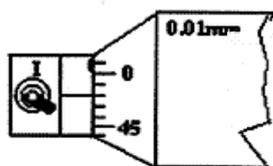
ความคลาดเคลื่อนของไมโครมิเตอร์ (Zero Error): ไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน เมื่อปากวัด C-D สัมผัสพอดี ขีดที่ศูนย์ของสเกลวงกลมจะทับกับแกนนอนของสเกลหลัก และขอบของสเกลวงกลมจะทับขีดที่ศูนย์ของสเกลหลักพอดี ดังแดงในภาพผนวกที่ ข3



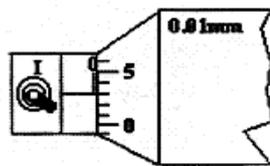
ภาพผนวกที่ ข3 ตัวอย่างไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน

ที่มา: ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล, ม.ป.ป.

แต่ในบางครั้งอาจเกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นได้ ดังกรณีในภาพผนวกที่ ข4.1 เมื่อใช้วัดของสิ่งใดแล้วจะได้ค่าน้อยกว่าความเป็นจริงอยู่ 0.020 มิลลิเมตร เสมอ ดังนั้นเมื่ออ่านค่าการวัดใดๆ แล้วจึงต้องบวกด้วย 0.020 มิลลิเมตร เข้าไปด้วย และสำหรับในกรณีภาพผนวกที่ ข4.2 เมื่อใช้วัดสิ่งใดแล้วจะได้ค่ามากกว่าความเป็นจริงอยู่ 0.030 มิลลิเมตร ดังนั้นเมื่ออ่านค่าการวัดใดๆ แล้วจึงต้องลบออกด้วย 0.030 มิลลิเมตร เสมอ



4.1



4.2

ภาพผนวกที่ ข4 ตัวอย่างไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพไม่พร้อมใช้งาน

ที่มา: ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล, ม.ป.ป.

ภาคผนวก ค

วิธีการทำอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE

ภาคผนวก ก

วิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

การเตรียม Separating Gel

1. ประกอบ mini-gel apparatus (Bio-Rad, Mini Protein II) ตามวิธีประกอบ แผ่นแก้วต้องสะอาดและแห้ง สวมถุงมือในการประกอบเครื่อง
2. ผสมสารละลายของเจล ตามตารางผนวกที่ 1 โดยผสมสารละลายต่าง ๆ ตามตารางใน sidearm flask ยกเว้น APS และ TEMED ซึ่งจะใส่หลังการ degas แล้ว 15 นาที โดยค่อยๆผสม APS และ TEMED ลงในสารละลายที่ผ่านการ degas เพื่อช่วยให้เกิด polymerization
3. ใช้ Pasteur pipette ดูดเจลใส่ลงช่องระหว่างแผ่นแก้ว (ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ) จนระดับประมาณ 1.5 ถึง 2 เซนติเมตรจากขอบบนของแผ่นแก้วที่มีระดับต่ำกว่า ทำโดยรวดเร็วก่อนที่เจลจะแข็งตัว
4. ใช้ Pasteur pipette อันใหม่ดูดสารละลาย water-saturated isobutyl alcohol ปิดทับ gel (หนาประมาณ 3 มิลลิเมตร)
5. ตั้งทิ้งไว้ 45-60 นาที ให้เจลเกิดการ polymerize ได้ isobutyl alcohol ซึ่งจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและสารละลายที่คลุมผิวเจลอย่างชัดเจน
6. เมื่อเจล polymerize ให้ดูด water-saturated isobutyl alcohol ออกทันทีด้วย Pasteur pipette ล้างส่วนบนของเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งและซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง

* ถ้าเก็บไว้ทำวันต่อไปให้ปิดทับด้วย 1:4 solution B จำนวน 5 มิลลิลิตร เพื่อกันไม่ให้แห้ง

ตารางผนวกที่ ๑1 สูตรสำหรับการเตรียม SDS-PAGE Separating and Stacking Gel

ส่วนประกอบ	Separating Gel		Stacking Gel
	(0.375 M Tris, pH 8.8)		(0.125 M Tris, pH 6.8)
	16.5% gel	7.5% gel	4% gel
1. Distilled Water	1.85 ml	4.85 ml	6.1 ml
2. 1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	-
3. 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	-	-	2.5 ml
4. 10% (w/v) SDS	100 μ l	100 μ l	100 μ l
5. Acrylamide/bis (30%, 2.67%(Stock)	5.5 ml	2.5 ml	1.33 ml
(Degas for \geq 15 min at room temperature)			
6. 10% ammonium persulfate (fresh daily)	50 μ l	50 μ l	50 μ l
7. TEMED	5 μ l	5 μ l	10 μ l
TOTAL MONOMER	10 ml	10 ml	10 ml

การเตรียม Stacking Gel

1. เตรียม 10 มิลลิลิตรของ Stacking gel ตามตารางการเตรียมในข้อ 2 โดยผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันใน sidearm flask ที่ผ่านการ degas แล้ว 15 นาที จึงค่อยๆเติม APS และ TEMED ลงไป
2. ชั้บตอนบน Separating gel ให้แห้งด้วยกระดาษกรองอย่าให้มีฟองอากาศค้างอยู่บน gel
3. คูด Stacking gel ด้วย Pasteur pipette ที่สะอาด ค่อย ๆ ใส่ลงตรงกลางลงมาตามด้านข้างของ spacer จนได้ความสูงของเจลในแผ่นแก้วประมาณ 3 เซนติเมตร
4. ค่อย ๆ สอด Teflon Comb ลงในชั้น Stacking gel ที่ละช่องเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศ ไว้โดยเติม Stacking gel ให้เต็ม
5. ปล่อยให้เจล polymerize 30-40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

Loading ตัวอย่าง

การ load ตัวอย่างมี 2 วิธี คือ ใส่ในหลุมเจลที่เตรียมโดยใช้ well-forming comb หรือ load ตัวอย่างเคียวบน gel surface ในกรณีตัวอย่างเหลว

1. Loading Sample Well

เตรียมตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร โดยละลายตัวอย่างโปรตีนใน sample buffer ที่มี 10% glycerol อย่างน้อย 1 เท่าของตัวอย่างโปรตีนใน microcentrifuge tube ปิดฝา นำไปต้ม 1 นาที ที่ 100°C (ตามคู่มือของ BIORAD ให้เจือจางตัวอย่างอย่างน้อย 1:4 เท่าด้วย sample buffer และต้มที่ 95°C นาน 4 นาที) ถ้าตัวอย่างแห้งละลายด้วย sample buffer จำนวน 50-100 μ l ทำให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องแล้วหมุนเหวี่ยงให้ตัวอย่างใส นำตัวอย่างใส่ลงในหลุมกลางเจล

1.1 เตรียม electrode buffer 300 มิลลิลิตร โดยผสม 5x electrode buffer 60 มิลลิลิตร กับน้ำ 240 มิลลิลิตร

1.2 เลื่อนระดับ inner cooling core ลงใน buffer chamber อันล่างเติม buffer ประมาณ 115 มิลลิลิตร ใน upper buffer chamber ซึ่งอยู่ด้านบน แล้วเติมเพิ่มจนระดับครึ่งหนึ่งระหว่าง short และ long plate อย่าให้ดิน chamber อันบน

1.3 เติม buffer ที่เหลือใส่ chamber ล่างจนท่วม gel คอนล่าง 1 เซนติเมตร ถ้ามี ฟองอากาศใช้ปิเปตต์กวาดไล่ฟองอากาศ

1.4 ใส่ตัวอย่าง 5 μ l ลงใน well ข้างใต้ electrode buffer ด้วย Hamilton syringe หรือปิเปตต์ การใส่ตัวอย่างให้ปล่อยตัวอย่างลงที่ระยะ 1-2 มิลลิเมตร จาก well bottom โดยให้ปลาย syringe หรือปิเปตต์จรดที่บริเวณมุมของหลุม

2. Loading a Single Sample per gel

เป็นการแยกตัวอย่างบน flat gel surface ในการวิเคราะห์ เตรียม stacking gel ให้ถึงระดับ 1 มิลลิเมตร จาก short plate โดยไม่ใช้ comb ปิดทับด้วย overlay solution เมื่อเจลแข็งแล้วรินออกและ ประกอบส่วน core บรรจุ electrode buffer ลงใน chamber บนและล่าง แล้วค่อย ๆ ใส่ตัวอย่างให้ สม่่าเสมอรึ่เริ่มจาก gel ด้านหนึ่งจนตลอดตามยาวโดยใส่ลงให้ใกล้ผิวเจลมากที่สุด (1-2 มิลลิเมตร)

Running the gel

เมื่อ apply โพรตีน ตัวอย่างจะอยู่ระหว่าง electrode และเมื่อ apply potential ก็จะครบวงจร โพรตีนจะเคลื่อนที่ไปเป็นแถบ (band) สีน้ำเงิน ซึ่งจำนวนแถบคือจำนวนชนิดของโปรตีน

1. ปิดฝาของ chamber อันล่าง
2. ต่อ electrical lead กับ power supply (200V minimum) ปรับกระแสไฟ 60 mA ต่อ gel (120mA ต่อ 2 gel) หลังจาก run 45 นาที กระแสจะลดไปที่ 30mA ต่อเจลซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของไอออนใน buffer ทำให้เกิดความต้านทานเพิ่มขึ้น

Removing the gel

1. ปิด power supply และเอาสายที่ต่อออก
2. เปิดฝาเซลล์นำ cooling core ขึ้นในจุ่มมาจาก chamber ล่าง เท buffer ใน chamber อันบนทิ้งไป
3. ดัน clamp ออกจาก cooling core
4. คลายสกรู sandwich clamp assemblies ออก
5. นำแผ่น sandwich ออกและใช้ forcep ขูดน้ำกลั่นค่อยๆดันแผ่นแก้วออกในระหว่างที่ดันแผ่นแก้วออกให้ใช้น้ำกลั่น rinse ตามตลอด

การทำ Staining

การย้อมสีโดยวิธี Commassie Brillian Blue R-250

1. เตรียม Staining solution คือ 0.1% (w/v) Commassie Brillian Blue ใน 40% Methanol, 10% (v/v) Acetic acid เมื่อสีละลายแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง
2. ค่อยนำเจลบนแผ่นแก้วมาใส่ในถาดที่มี Staining solution ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

การทำ Destaining

นำเจลมาแช่ในสารละลาย 40% Methanol, 10% Acetic acid เปลี่ยนสารละลายที่ใช้หลายๆ ครั้ง จะเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน

* การ Stain และ Destain ทำที่อุณหภูมิห้อง และควรเขย่าเบาๆ บน orbital shaker

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. Acrylamide/bis (30% T, 2.67% C)

ชั่ง acrylamide 29.2 กรัม และ methylenebisacrylamide 0.8 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร กรองและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด (เก็บไว้ได้ไม่เกิน 30 วัน)

ความเข้มข้นของ acrylamide เป็นตัวกำหนดความยาวของสารพอลิเมอร์ ส่วนความเข้มข้นของ methylenebisacrylamide เป็นตัวกำหนดขนาดของการเชื่อมโยงเป็นตาข่ายร่างแห ส่วนประกอบของ polyacrylamide gel มีตัวแปรอยู่ 2 ชนิดคือ % T และ % C

% T คือ ความเข้มข้นของโมโนเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างเจล มีหน่วยเป็น กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

$$\% T = \frac{\text{acrylamide (กรัม)} + \text{methylenebisacrylamide (กรัม)}}{\text{ปริมาตรทั้งหมด}} \times 100$$

% C คือ น้ำหนักเป็นกรัมของ methylenebisacrylamide ต่อน้ำหนักเป็นกรัมของ acrylamide กับน้ำหนักเป็นกรัมของ methylenebisacrylamide

$$\% C = \frac{\text{methylenebisacrylamide (กรัม)}}{\text{acrylamide (กรัม)} + \text{methylenebisacrylamide (กรัม)}} \times 100$$

2. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ชั่ง Tris base 27.23 กรัม ใส่น้ำปราศจากอ็อกซิเจนประมาณ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย สารละลาย HCl ความเข้มข้น 6 N แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 150 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

ชั่ง Tris base 6 กรัม ใส่น้ำปราศจากอ็อกซิเจนประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย สารละลาย HCl ความเข้มข้น 6 N แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 10% SDS

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำปราศจากอ็อกซิเจนประมาณ 90 มิลลิลิตร คนเบา ๆ และปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร

5. Sample buffer

มีส่วนประกอบดังนี้ (หน่วยเป็น มิลลิลิตร)

น้ำปราศจากอ็อกซิเจน	3.8
0.5 M Tris-HCL, pH 6.8	1.0
Glycerol	0.8
10% SDS	1.6
2-mercaptoethanol	0.4
1% (w/v) bromophenol blue	0.4
ปริมาตรรวม	8.0

6. 5X electrode (Running) buffer, pH 8.3

ชั่ง Tris base 9 กรัม Glycine 43.2 กรัม และ SDS 3 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 600 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้ทำการเจือจางสารละลาย 5X electrode (Running) buffer ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน 240 มิลลิลิตร

7. Staining solution

เติม Coomassie brilliant blue R-250 1 กรัม ใน fixing solution (มีส่วนผสมของ methanol 40% และ กรดอะซิติก 10%) ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร คนจนละลายหมด กรองเก็บในขวดแก้วที่อากาศเข้าไม่ได้

8. Destaining solution

เตรียมโดยเติม methanol 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 825 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม กรดอะซิติก (Glacial)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	7 พฤศจิกายน 2526
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ระดับปริญญาตรี ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	เข้าร่วมเสนอผลงานภาคบรรยายในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2549 และโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปีงบประมาณ 2549