วิทยานิพนธ์

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้

COLLAGEN EXTRACTION FROM SILVER-LINE GRUNT SKIN AND SOME CHARACTERISTICS OF EXTRACTED COLLAGEN

นางสาวนันทพร อัคนิจ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร | วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้

Collagen Extraction from Silver-line Grunt Skin and Some Characteristics of Extracted Collagen

นามผู้วิจัย นางสาวนันทพร อัคนิจ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, Ph.D.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณี จิรภาคย์กุล, Ph.D.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์นงนุช รักสกุลไทย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบูลย์ สัจจาอนันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้

Collagen Extraction from Silver-line Grunt Skin and Some Characteristics of Extracted Collagen

โดย

นางสาวนันทพร อัคนิจ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)
พ.ศ. 2550

นันทพร อัคนิจ 2550: การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, Ph.D. 76 หน้า

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดสด โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 0.1% (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วตกตะกอนแยกคอลลาเจนโดยปรับสารละลายให้มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.9 M โดยทำการสกัดที่สัดส่วนหนังต่อกรด (กรัมต่อมิลลิลิตร) 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 พบว่าเมื่อสัดส่วนของกรดเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณผลได้ของคอลลาเจน (Yield) ลดลง จึงเลือกใช้สัดส่วน 1:10 ในการสกัดคอลลาเจนที่อุณหภูมิต่าง ๆ (4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณผลได้มากที่สุด คือ 439.32 มิลลิกรัมต่อกรัมหนังปลาสดที่หักลบความชื้น จากการศึกษาหน่วยย่อยของคอลลาเจนโดยการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นคอลลาเจน type I ซึ่งประกอบไปด้วยสาย β $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ การสกัดคอลลาเจนที่อุณหภูมิสูง (20 และ 28 องศาเซลเซียส) จะได้เปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเนื่องจากเกิดการย่อยหนังปลาโดยกรดและเอนไซม์อย่างรวดเร็ว จึงไม่สามารถตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 M ทำให้ปริมาณผลได้ต่ำ คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิในการเสียสภาพเท่ากับ 39.5 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่มีอุณหภูมิในการเสียสภาพเท่ากับ 37.5 องศาเซลเซียส ส่วนคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 20 และ 28 องศาเซลเซียส ไม่สามารถวัดอุณหภูมิในการเสียสภาพได้เนื่องจากประกอบด้วยเปปไทด์โมเลกุลขนาดเล็กจำนวนมาก จากการศึกษาการจับตัวกันของคอลลาเจน พบว่า คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีอัตราเร็วในการจับตัวกันสูงที่สุด ศึกษาโครงสร้างของคอลลาเจนเมตริกซ์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ confocal laser scanning microscope พบว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีขนาดเท่ากับ 0.5 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เส้นผ่าศูนย์กลาง เท่ากับ 0.41 ไมโครเมตร) เมื่อเวลาในการปล่อยให้เกิดการจับตัวเท่ากัน (4 ชั่วโมง) เส้นใยคอลลาเจนจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการจับตัวกัน

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Nuntaporn Aukkanit 2007: Collagen Extraction from Silver-line Grunt Skin and Some Characteristics of Extracted Collagen. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Associate Professor Wunwiboon Garnjanagoonchon, Ph.D. 76 pages.

Collagen extraction from fresh silver-line grunt skin was carried out by using 0.5 M acetic acid combined with pepsin at a concentration of 0.1% (w/v) for 6 hours at 28°C. Collagen was precipitated by adjusting NaCl in the solution to a concentration of 0.9 M. The ratios of skin to acetic acid (g/ml) were tested at 1:10, 1:15, 1:20 and 1:25. The results showed that the yield of collagen decreased as ratio of skin to acid increased. Therefore, the ratio 1:10 was used for collagen extraction at different temperatures (4, 10, 20 and 28°C) for 6 hours. The extraction at 10°C with acid ratio at 1:10 gave the highest yield (439.32 mg/ g skin dry basis). The SDS-PAGE pattern of extracted collagen was type I collagen which comprised β $\alpha 1$ $\alpha 2$ chains. Extraction of fish skin at high temperatures (20 and 28°C) resulted in the formation of low molecular weight peptide fragments due to the rapid rate of acid and pepsin digestion which cannot be precipitated by 0.9M NaCl and gave a low yield of extracted collagen. The denaturation temperature of extracted collagen at 4°C is 39.5°C which is higher than that extracted at 10°C which the denaturation temperature is 37.5°C. The denaturation temperature of extracted collagen at 20 and 28°C could not be detected due to its high composition of low molecular weight peptide fragments. The study of collagen self-assembly showed that collagen extracted at 10°C gave the highest rate of collagen self-assembly. Examination of the structure of reconstructed collagen by confocal laser scanning microscope indicated that the fibril diameter of extracted collagen at 10°C is 0.5 μm which is larger than that extracted at 4°C (fibril diameter is 0.41 μm) within the same incubation time of collagen self-assembly (4 hours). The fibrils had a larger diameter when increase incubation time.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ดิฉันขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการทำการวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณี จิรภาคย์กุล กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช รักสกุลไทย กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และรองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ ลิ้มสุวรรณ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.มาศอุบล ทองงาม และ คุณกมลวรรณ อิศราคาร ที่ให้ความรู้วิธีการใช้และให้ความช่วยเหลือในการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal laser scanning microscope (CLSM) ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาริฉัตร หงสประภาส ที่ให้ความอนุเคราะห์สีย้อม FITC ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สงวนศรี เหรียญเจริญ และคุณธัญญารัตน์ คำดี ที่ให้ความรู้วิธีการใช้และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่อง DSC

ขอขอบคุณ บริษัทยูเนี่ยน โฟร์สเซ่นส์ โปรดักส์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์หนังปลาสีกูด และขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยนี้

สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดา มารดา ขอบคุณพี่ น้อง ที่ช่วยให้คำปรึกษาในทุก ๆ เรื่องและให้กำลังใจตลอดมา ตลอดจน พี่ เพื่อน น้อง ๆ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ที่มีส่วนช่วยเหลือทุกอย่าง

นันทพร อัคนิจ

เมษายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	30
สรุปและข้อเสนอแนะ	50
สรุป	50
ข้อเสนอแนะ	51
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	52
ภาคผนวก	57
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	58
ภาคผนวก ข วิธีการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS	61
ภาคผนวก ค กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจน	69
ภาคผนวก ง ค่าการดูดกลืนแสงในการศึกษาอัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจน	74
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	76

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบกรดอะมิโนของคอลลาเจนจากหนังของวัว สุกร ปลาตาหวาน และปลาสีกูด(residues/1000 residues)	8
2	ชนิดของคอลลาเจน หน่วยย่อย และตำแหน่งที่พบ	12
3	ความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในการตกตะกอนคอลลาเจนชนิดต่าง ๆ	16
4	ค่าความหนืด (cp) ของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง	32
5	ค่าความหนืด (cp) ของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง	37
6	สัดส่วนความเข้มของแถบโปรตีนของหน่วยย่อยของคอลลาเจน	42
7	อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสดที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส และคอลลาเจนจากหนังลูกวัว และคอลลาเจนที่สกัดโดย Noitup (2004)	44
8	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ และปล่อยให้จับตัวกันที่เวลาต่าง ๆ	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก1	วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณผลได้ (Yield) หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่สัดส่วนต่าง ๆ	59
ก2	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณผลได้ (Yield) หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่สัดส่วนต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT)	59
ก3	วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณผลได้ (Yield) หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิต่าง ๆ	60
ก4	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณผลได้ (Yield) หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT)	60
ข1	สูตรสำหรับการเตรียม SDS-PAGE Seperating and Stacking Gel	63
ง1	ค่าการดูดกลืนแสงในการศึกษาอัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ	75

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพตัดขวางของผิวหนังปลา	4
2	โครงสร้างของกรดอิมิโนไฮดรอกซีโพรลีนและไฮดรอกซีไลซีน	7
3	โครงสร้างของคอลลาเจน	9
4	พันธะภายในโมเลกุลและพันธะข้ามระหว่างโมเลกุลของโทรโปคอลลาเจน	10
5	การตัดพันธะส่วนปลายของโทรโปคอลลาเจนโดยเอนไซม์เปปซิน	14
6	ความสัมพันธ์ของปริมาณกรดอิมิโนและความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจนจากสัตว์ชนิดต่าง ๆ	19
7	ความหนืดของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ 28 องศาเซลเซียส	31
8	ปริมาณผลได้คอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ 28 องศาเซลเซียส	33
9	ลักษณะของคอลลาเจนบน 7.5% SDS-PAGE ของคอลลาเจนที่สกัดโดยใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	34
10	ความหนืดของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 ที่อุณหภูมิต่างๆ (4 10 และ 20 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง	35
11	ความหนืดของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง	36
12	ปริมาณผลได้คอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 สกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ (4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

13 ลักษณะของคอลลาเจนบน 7.5% SDS-PAGE สกัดโดยใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง 41

14 อัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส 46

15 โครงสร้างคอลลาเจนเมตริกซ์ที่กำลังขยาย 40 เท่าของเลนส์วัตถุ 48

16 โครงสร้างคอลลาเจนเมตริกซ์ที่กำลังขยาย 100 เท่าของเลนส์วัตถุ 49

ภาพผนวกที่

ค1 กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 70

ค2 กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส 71

ค3 กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังวัว 72

ค4 กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดโดย Noitup (2004) 73

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้

Collagen Extraction from Silver-line Grunt Skin and Some Characteristics of Extracted Collagen

คำนำ

ประเทศไทยผลิตเนื้อปลาแช่เยือกแข็งและส่งออกไปขายต่างประเทศจำนวนมาก ในขั้นตอนการผลิตมีเศษเหลือ เช่น หนัง เกล็ด ก้าง เป็นต้น ส่วนใหญ่แล้วจะนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งมีมูลค่าเพิ่มไม่มากนัก เศษเหลือเหล่านี้มีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบ ซึ่งปัจจุบันมีการนำคอลลาเจนมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร ใช้ในทางการแพทย์และทางเภสัชกรรม เช่น ผลิตเป็นผิวหนังเทียมเพื่อรักษาแผลสดบริเวณผิวหนัง (Takai *et al*., 1997) เป็นสารช่วยสมานบาดแผล ใช้เป็นแคปซูลยา ใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิวและในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง (Swan and Torley, 1991) ในอุตสาหกรรมการผลิตคอลลาเจนวัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่ คือ หนังวัวและหนังสุกร (Nagai *et al*., 2002) จึงมีการหาแหล่งวัตถุดิบต่างๆ อีกมากมายที่สามารถนำมาผลิตคอลลาเจนได้ โดยเฉพาะสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นแหล่งของคอลลาเจนที่น่าสนใจ

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการล้างทำความสะอาดวัตถุดิบ แล้วจึงทำให้คอลลาเจนที่มีอยู่ละลายออกมาโดยใช้กรด เช่น กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M (Kittiphattanabawon *et al*., 2005) หรือการใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์เปปซิน (Noitup, 2004; Senaratne *et al*., 2006) เนื่องจากสามารถทำงานได้ที่ pH ต่ำ(pH 2-3) และมีความจำเพาะในการตัดส่วนทีโลเปปไทด์ และการสกัดโดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินทำให้ได้คอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าการสกัดโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว (Bailey and Light, 1989) จากนั้นจึงนำไปตกตะกอนโดยใช้เกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ วัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนมีความหลากหลาย เช่น หนังปลาสด (Sadowska *et al*., 2003; Kittiphattanabawon *et al*., 2005) และหนังปลาแห้ง (Nagai *et al*., 2002; Noitup, 2004) เกล็ดและก้างปลา(Ogawa *et al.,* 2004) เป็นต้น

เนื่องจากมีปัจจัยต่าง ๆ เกี่ยวข้องในการสกัดคอลลาเจน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงปรับการสกัดของ Noitup (2004) โดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ และศึกษาผลของสัดส่วนของกรดและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการผลิตคอลลาเจนจากหนังปลาซึ่งเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมประมง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกุดสด
2. ศึกษาลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของปลาสีกูด

ปลาสีกูดหรือปลากะพงแสม (silver-line grunt) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pomadasys kaakan* อยู่ในตระกูล Haemulidae วงศ์ Perciformes ลำตัวมีขนาดยาวที่สุดประมาณ 80 เซนติเมตร ลำตัวมีสีเงินและสีเหลืองบริเวณขอบลำตัว อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งที่มีความลึกประมาณ 75 เมตร มีความสามารถในการทนต่อน้ำทะเลที่มีปริมาณเกลือต่ำ ส่วนใหญ่นำมาบริโภคเป็นอาหาร เป็นปลาทะเลเขตร้อน พบในประเทศออสเตรเลีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย เวียดนาม ไต้หวัน และแอฟริกาใต้ อุณหภูมิของที่อยู่อาศัยประมาณ 26-35 องศาเซลเซียส (Smith and Mckay, 1986)

2. ผิวหนังปลา

ผิวหนังปลาเป็นที่อยู่ของส่วนประกอบต่าง ๆ ได้แก่ เกล็ด ต่อมเมือก ต่อมพิษ เซลล์สร้างสี ประสาทรับความรู้สึก นอกจากนี้ผิวหนังยังช่วยปรับความสมดุลของน้ำและเกลือ ช่วยขับถ่ายของเสียและหายใจ องค์ประกอบของผิวหนังปลาประกอบด้วย ความชื้น 64% โปรตีน 32% เถ้า 3% และ ไขมัน 1% (Kittiphattanabawon *et al*., 2005) โครงสร้างผิวหนังของปลา ประกอบด้วย ผิวหนังชั้นนอก และผิวหนังชั้นใน (วิมล, 2540; อัมพร, 2545) (ดังภาพที่ 1)

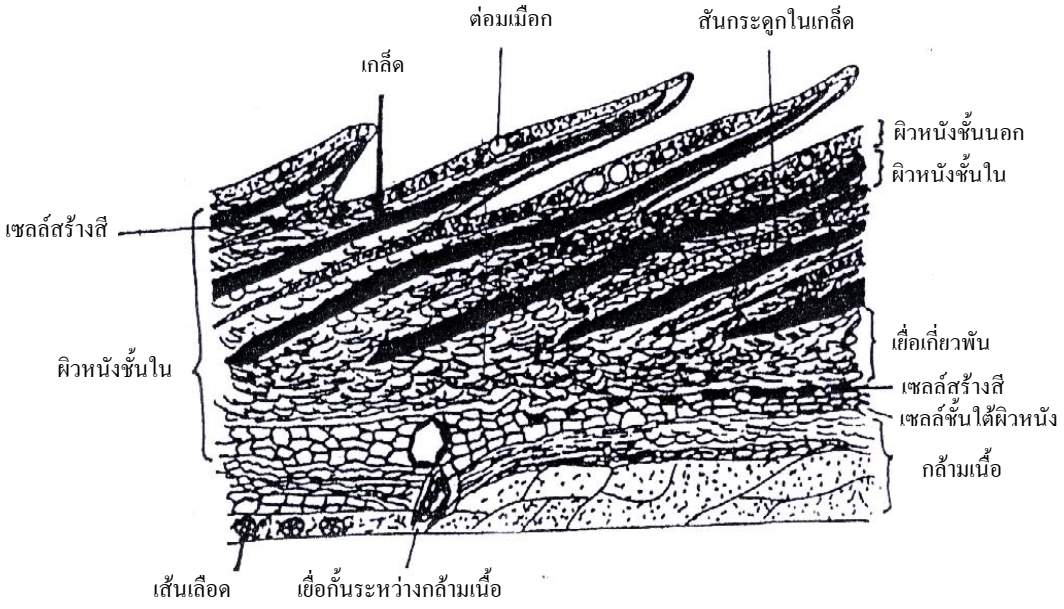
2.1 ผิวหนังชั้นนอก (epidemis)

เจริญมาจากเยื่อชั้นนอก (ectoderm) เป็นเซลล์หลายชั้น ซึ่งมีลักษณะแบนและชั้นจำนวนชั้นขึ้นอยู่กับบริเวณของร่างกายและอายุของปลา เซลล์ชั้นบนเป็นชั้นที่ตายและหลุดลอกออกไป โดยมีเซลล์ชั้นถัดไป เรียกว่า สตราตัม เจอร์มินาติวัม (stratum germinativum) ซึ่งเป็นชั้นที่สามารถสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทนตลอดเวลา ความหนาบางของผิวหนังชั้นนอกขึ้นกับโครงสร้างผิวหนังของปลาแต่ละชนิด ผิวหนังชั้นนี้มีต่อมเมือก (mucus gland) ซึ่งเป็นต่อมที่มีหน้าที่สร้างเมือกเพื่อให้ความชุ่มชื่นแก่ผิวหนังและลดแรงต้านน้ำ ผิวหนังชั้นนอกจะบางและมีโครงสร้างง่าย ๆ แต่ในบางส่วนอาจจะมีปลายประสาทรับความรู้สึก เป็นที่อยู่ของเซลล์สร้างสี

และต่อมสร้างพิษรวมอยู่ด้วย ผิวหนังชั้นนอกประกอบด้วยสารพวกมิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ไขมัน โปรตีน ไกลโคเจน และไลโซไซม์ (Johns, 1977)

2.2 ผิวหนังชั้นใน (dermis หรือ corium)

เจริญมาจากเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) มีความหนาและโครงสร้างที่ซับซ้อนมากกว่าผิวหนังชั้นนอก ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งได้แก่ คอลลาเจนและอิลาสติน ตอนบนมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ เรียกว่า สตราตัม วาสคูลาร์ (stratum vascular) หรือ สตราตัม สปองจิโอซัม (stratum spongiosum) และตอนล่างเป็นส่วนที่หนาแน่น เรียกว่า สตราตัม คอมแพคตัม (stratum compactum) ยกเว้นในส่วนที่ปกคลุมครีบจะเปลี่ยนไปเป็นเนื้อเยื่อชั้นฐาน (basal membrane) ชั้นของสตราตัม สปองจิโอซัม ประกอบด้วยเส้นเลือดและเส้นใยคอลลาเจนซึ่งเกาะกันอย่างหลวม ๆ ปริมาณของคอลลาเจนในชั้นนี้จะน้อยกว่าคอลลาเจนในชั้นสตราตัม คอมแพคตัม ซึ่งประกอบด้วยคอลลาเจนที่มีอยู่อย่างหนาแน่น ภายในผิวหนังชั้นนี้จะมีเส้นเลือด เส้นประสาท อวัยวะรับสัมผัสที่ไวมาก เป็นชั้นที่สร้างเกล็ดและส่วนประกอบอื่น ๆ ของผิวหนัง ปลาที่เจริญเต็มวัยจะมีผิวหนังชั้นในหนากว่าชั้นนอก ความหนาของผิวหนังขึ้นกับจำนวนชั้นและการอัดแน่นของชั้น โดยเฉพาะที่ผิวหนังชั้นในซึ่งจะเปลี่ยนแปลงมากน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของปลา



ภาพที่ 1 ภาพตัดขวางของผิวหนังปลา
ที่มา : วิมล (2540)

3. ชนิดของโปรตีนสัตว์

โดยทั่วไปสามารถจำแนกโปรตีนสัตว์ออกเป็น 3 ประเภท ตามความสามารถในการละลาย (Whitaker and Tannenbaum, 1977) คือ

3.1 ซาร์โคพลาสมิกโปรตีน (sarcoplasmic protein) เป็นโปรตีนที่สามารถละลายน้ำหรือสารละลายเกลือที่มีค่า ionic strength น้อยกว่า 0.1 พบอยู่ในซาร์โคพลาสซึม ได้แก่ เอนไซม์ ไมโอโกลบิน ฮีโมโกลบิน และเม็ดสีต่าง ๆ เป็นต้น

3.2 ไมโอไฟบริลลาร์โปรตีน (myofibrilar protein) เป็นโปรตีนไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือที่มีค่า ionic strength มากกว่า 0.1 (โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 0.3-1.0) เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในกล้ามเนื้อสัตว์ ตัวอย่างเช่น แอกติน (actin) และ ไมโอซิน (myosin) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ

3.3 สตรอมาโปรตีน (stroma protein) เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง แต่ละลายในสารละลายกรดและด่าง พบอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ คอลลาเจน (collagen) และ อิลาสติน (elastin)

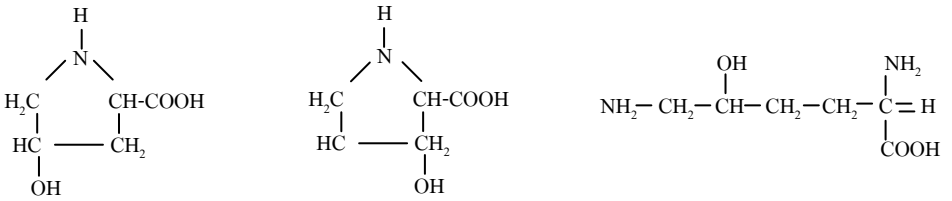
4. คอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนโครงสร้างหลักที่พบในร่างกายสัตว์พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) โดยมีอยู่ประมาณ 30% ของส่วนที่เป็นโปรตีนทั้งหมดในร่างกายสัตว์ โดยพบคอลลาเจนในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ได้แก่ ผิวหนัง กระดูก เอ็น และกระดูกอ่อน (Bailey and Light, 1989) คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (fibrous protein) เกิดจากกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ และมีการจัดเรียงตัวกันที่มีความจำเพาะ โดยมีพันธะต่าง ๆ ทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนมีความแข็งแรงคงตัวมากขึ้น

4.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนที่พบส่วนใหญ่ในคอลลาเจน ได้แก่ ไกลซีน (Glycine) เป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุด ประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมดในโมเลกุลคอลลาเจน และมีกรดอิมิโน (imino acid) ประมาณ 1 ใน 4 โดยแยกเป็นโพรลีน (Proline) 12 % และไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) 11 % (Ward and Courts, 1977) นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนชนิดอื่น ได้แก่ อะลานีน (Alanine) ซึ่งพบมากเช่นเดียวกับไฮดรอกซีโพลีน ซึ่งมีปริมาณ 1 ใน 7 ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด ส่วนฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ไทโรซีน (Tyrosine) และฮิสติดีน (Histidine) มีปริมาณเล็กน้อย ซิสเตอีน (Cysteine) พบเฉพาะในคอลลาเจน type III และ type IV เท่านั้น เมไทโอนีน (Methionine) พบในปริมาณน้อยมากในคอลลาเจนทุกชนิด ส่วนทริปโตเฟน (Tryptophan)ไม่พบในคอลลาเจน ซึ่งลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนจะมีลักษณะซ้ำ ๆ กันของ -Gly-X-Y- โดย Gly คือ ไกลซีน X และ Y มักเป็นโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนตามลำดับ นอกจากนี้ตำแหน่ง X ยังอาจเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น เช่น กลูตามีน (Glutamine) ลิวซีน (Leucine) และฟีนิลอะลานีน ส่วนตำแหน่ง Y อาจเป็นกรดอะมิโนชนิดทรีโอนี (Threonine) ไลซีน (Lysine) และอาร์จินีน (Arginine) เป็นต้น

กรดอะมิโนที่มีความจำเพาะในคอลลาเจน คือ ไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งการสังเคราะห์ไฮดรอกซีโพรลีนเกิดขึ้นหลังจากการสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์แล้ว โดยโพรลีนจะเปลี่ยนเป็นไฮดรอกซีโพรลีน โดยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่น (Hydroxylation) ซึ่งเร่งโดยเอนไซม์โพรลิล-ไฮดรอกซิเลส (Prolyl hydroxylase) และกรดแอสคอบิก เป็นตัวรีดิวซ์ (Stryer, 1975) การเกิดปฏิกิริยานี้มีความจำเพาะคือ จะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เฉพาะโพรลีนที่ตำแหน่ง Y ของ Gly-X-Y เท่านั้น ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง X จะมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา คือ เอนไซม์จะมีกิจกรรมสูงที่สุดเมื่อตำแหน่ง X เป็นโพรลีน แต่กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง 20 เท่า เมื่อตำแหน่ง X เป็นกรดกลูตามิก (Glutamic acid) (Bailey and Light, 1989) เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานเมื่อสายโพลีเปปไทด์บิดเป็นเกลียวสามสาย (triple helix) นอกจากนี้ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นยังสามารถเกิดได้กับกรดอะมิโนชนิดอื่นคือ ไลซีน เป็นไฮดรอกซีไลซีน (Hydroxylysine) โดยเอนไซม์ไลซิล ไฮดรอกซิเลส (Lysyl hydroxylase) ไลซีนจะเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นได้น้อยกว่าโพรลีน 10-20 % ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นจะทำให้สายโพลีเปปไทด์ที่บิดเป็นเกลียวสามสายมีความคงตัวมากขึ้น โครงสร้างของกรดอิมิโนไฮดรอกซี โพรลีนและไฮดรอกซีไลซีนแสดงดังภาพที่ 2



4 - Hydroxyproline 3 – Hydroxyproline 5 – Hydroxylysine

ภาพที่ 2 โครงสร้างของกรดอิมิโนไฮดรอกซีโพรลีนและไฮดรอกซีไลซีน
ที่มา : Devlin (1997)

องค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจนจะมีผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของคอลลาเจน เช่น สมบัติการละลาย (ในสารละลายเกลือ) ความสามารถในการเกิดพันธะข้าม และความคงตัวต่อความร้อน (Lin and Liu, 2006a) สัตว์แต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 คอลลาเจนจากหนังสัตว์น้ำ ได้แก่ ปลาตาหวาน และปลาสีกูด มีปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนที่ต่ำกว่าคอลลาเจนจากหนังสัตว์บก (วัว และสุกร) ซึ่งปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนจะมีความสัมพันธ์กับความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน เนื่องจากไฮดรอกซีโพรลีนจะช่วยให้โครงสร้างของโทรโปรคอลลาเจนมีความคงตัวมากขึ้น (Jose and Harrington, 1964) ดังนั้น คอลลาเจนจากสัตว์บกจะมีความคงตัวต่อความร้อนที่สูงกว่าคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ ปริมาณกรดอะมิโนชนิดไทโรซีนของคอลลาเจนจากสัตว์ทุกชนิดจะมีปริมาณที่ต่ำมาก ซึ่งปริมาณของไทโรซีน บ่งชี้ถึงปริมาณทีโลเปปไทด์ คอลลาเจนที่สกัดโดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินจะมีปริมาณของไทโรซีนและฮิสติดีนที่ต่ำกว่าคอลลาเจนที่สกัดโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว (Noitup, 2004)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบกรดอะมิโนของคอลลาเจนจากหนังของวัว (bovine) สุกร (porcine) ปลาตาหวาน (bigeye snapper) และปลาสีกูด (silver-line grunt) (residues/1000 residues)

Amino acid	bovine[1]	porcine[1]	bigeye snapper[2]	silver-line grunt[3]
Aspartic acid	40.3	34.6	51	46.2
Hydroxyproline	129.1	125.4	77	71.0
Threonine	10.9	12.0	29	25.0
Serine	2.4	2.0	36	29.9
Glutamic acid	18.4	9.9	78	71.7
Proline	49.8	52.0	116	116.2
Glycine	411.8	396.8	286	327.4
Alanine	146.6	153.5	136	133.3
Valine	17.1	20.6	22	21.6
Methionine	12.1	10.2	12	14.7
Isoleucine	26.8	27.8	5	9.7
Leucine	37.1	42.8	24	20.3
Tyrosine	2.7	4.2	4	4.8
Phenylalanine	11.7	13.4	15	14.9
Hydroxylysine	-	-	10	3.9
Lysine	55.2	63.6	31	27.6
Histidine	10.1	12.8	10	7.0
Arginine	26.1	26.9	60	55.0

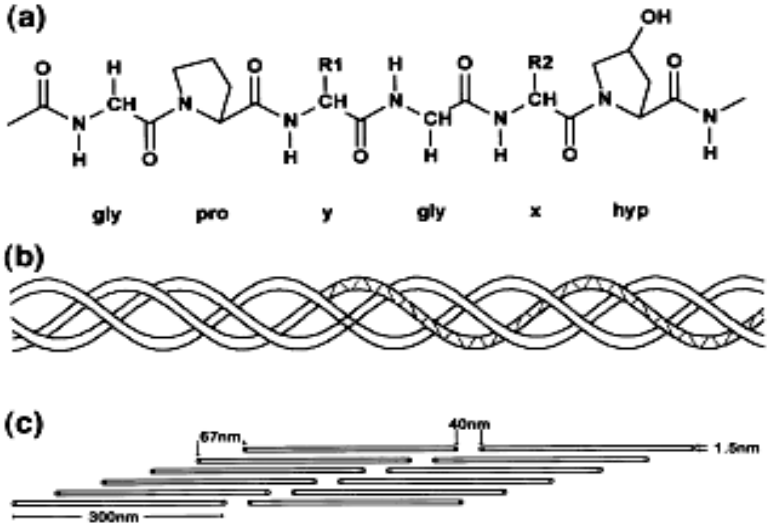
ที่มา : [1] Lin and Liu (2006a)

[2] Kittiphattanabawon *et al*. (2005)

[3] Noitup (2004)

4.2 โครงสร้างของคอลลาเจน

คอลลาเจนมีลักษณะเฉพาะ คือ มีโครงสร้างเป็นฮีลิกซ์สามสาย (triple-helix) ของโพลีเปปไทด์ ซึ่งแต่ละสายเรียกว่า สายแอลฟา (α-chain) โมเลกุลของคอลลาเจนประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 3 สาย แต่ละสายจะมีกรดอะมิโนมากกว่า 1000 ตัวต่อกัน ลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนจะมีลักษณะซ้ำ ๆ กันของ -Gly-X-Y- โดย X และ Y มักเป็นโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนตามลำดับดังภาพที่ 3(a)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของคอลลาเจน (a) ลำดับของกรดอะมิโน (b)โครงสร้างของโทรโปคอลลาเจน (c) การจัดเรียงตัวของโทรโปคอลลาเจนเป็นเส้นใยคอลลาเจน (gly, pro, hyp คือ glycine proline และ hydroxyproline)

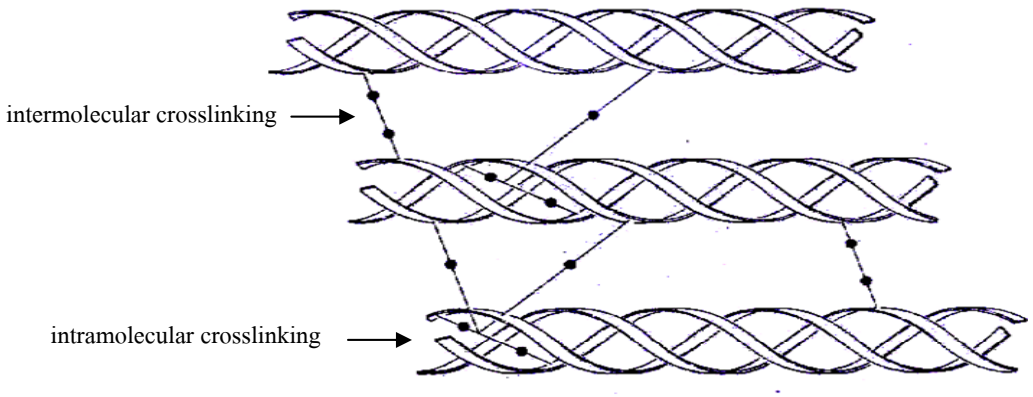
ที่มา: Friess (1998)

โพลีเปปไทด์แต่ละสายจะวนเป็นเกลียวไปทางซ้าย (left-hand helix) โดยมีพันธะไฮโดรเจน ซึ่งแต่ละรอบมี 3.3 residues และมีระยะห่างระหว่างเกลียวเท่ากับ 0.87 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 3(b) แต่ละสายของโพลีเปปไทด์จะไม่คงตัว ดังนั้นโพลีเปปไทด์จำนวน 3 สาย จะพันรอบกันเองเป็นเกลียววนขวา (right-hand helix) ซึ่งมีความคงตัวมากขึ้น โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายโพลีเปปไทด์แต่ละสาย เรียกสายโพลีเปปไทด์ที่บิดรวมกัน 3 สายนี้ว่า โทรโปคอลลาเจน (tropocollagen) มีระยะห่างระหว่างเกลียวประมาณ 8.6 นาโนเมตร น้ำหนักโมเลกุลของโทรโปคอลลาเจนประมาณ 300 kDa ความยาว 300 นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 นาโนเมตร ดังภาพที่ 3(c) นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว เรียก

บริเวณนี้ว่า ทีโลเปปไทด์ (telopeptide region) ประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียง 18 และ 25 ตัวในส่วนปลาย C- และ N- terminal

การที่โครงสร้างของคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเกลียว โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรง คงตัวมากขึ้น และเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ยาก ทำให้คอลลาเจนไม่สามารถละลายน้ำได้ โทรโปคอลลาเจนจะมาเรียงตัวขนานกันโดยมีแรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander Waals force) และไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) เชื่อมระหว่างโทรโปคอลลาเจนทำให้เกิดลักษณะเป็นเส้นใยของคอลลาเจน (Creighton, 1993)

ภายในโทรโปคอลลาเจนอาจมีการสร้างพันธะระหว่างสายฮีลิกซ์ (intramolecular crosslinking) กลายเป็น β-chain (สร้างพันธะระหว่าง α-chain 2 เส้น) หรือ γ-chain (สร้างพันธะระหว่าง α-chain 3 เส้น) นอกจากนี้ยังอาจมีการสร้างพันธะระหว่างโทรโปรคอลลาเจนเอง (intermolecular crosslinking) โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนหรือพันธะไฮโดรโฟบิกที่ตำแหน่งของไลซีนหรือไฮดรอกซีไลซีน ในส่วนของทีโลเปปไทด์ ทำให้เส้นใยคอลลาเจนมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 พันธะภายในโมเลกุลและพันธะข้ามระหว่างโมเลกุลของโทรโปคอลลาเจน
ที่มา: Stryer (1975)

4.3 ชนิดของคอลลาเจน

ปัจจุบันสามารถแบ่งคอลลาเจนออกเป็น 13 ชนิด โดยแบ่งตามลำดับของกรดอะมิโน มวลโมเลกุล ส่วนประกอบของหน่วยย่อย (subunit) ความยาวของสายฮีลิกซ์ คุณสมบัติและขนาดของส่วนที่ไม่เป็นฮีลิกซ์ (non-helix portion) (Kucharz, 1992) ดังตารางที่ 2

คอลลาเจน type I พบได้เป็นส่วนใหญ่ในสัตว์ชั้นสูง ในส่วนของหนัง เอ็น และกระดูก ซึ่งประกอบด้วย 3 สาย ได้แก่ สาย α1(I) จำนวน 2 สาย และ α2(I) จำนวน 1 สาย ซึ่งสาย α1 และ α2 จะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบสาย α1(I) จำนวน 3 สายซึ่งพบได้น้อยมาก คอลลาเจนชนิดนี้จะพบกรดอะมิโนชนิดไกลซีนประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด มีจำนวนกรดอะมิโนประมาณ 1,050 ตัว มีส่วนที่ไม่บิดเป็นเกลียวสั้นประกอบด้วยไทโรซีนและฮิสติดีน ไม่พบทริปโตเฟนและซีสเตอีน

คอลลาเจน type II พบได้ส่วนใหญ่ในกระดูกอ่อน ประกอบด้วยสาย α1(II) จำนวน 3 สาย ซึ่งเชื่อกันว่ามีลักษณะคล้ายสาย α1(I) มีปริมาณของไฮดรอกซีไลซีนสูงกว่า type I ถึง 3 เท่า

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 ซึ่งพบได้เฉพาะในร่างแหของเส้นใยฝอยที่เกาะกันหลวม ๆ (loose fibrillar network) ในเยื่อแผ่นบาง ๆ ที่อยู่นอกเซลล์ (basement membrane)

สำหรับคอลลาเจนชนิดอื่น ๆ จะพบในปริมาณที่น้อยมากและมีการเชื่อมโยงกับโครงสร้างทางชีววิทยาที่จำเพาะ ในการศึกษาส่วนใหญ่นิยมศึกษาคอลลาเจน type I เนื่องจากมีปริมาณมาก และมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะทางการแพทย์

ตารางที่ 2 ชนิดของคอลลาเจน หน่วยย่อย และตำแหน่งที่พบ

Type	Chain composition	Tissue distribution
I	$(\alpha 1(I))_2\ \alpha 2(I)$, trimer $(\alpha 1(I))_3$	Skin, tendon, bone, dentin, fibrocartilage, tendon
II	$(\alpha 1(II))_3$	Hyaline cartilage, vitreous, notochord
III	$(\alpha 1(III))_3$	Large vessels, dermis, intestine (usually coexists with type I except in bone and tendon)
IV	$(\alpha 1(IV))_2\ \alpha 2(IV)$	Basement membranes
V	$\alpha 1(V)\ \alpha 2(V)\ \alpha 3(V)$ or $(\alpha 1\ (V))_2\alpha 2(V)$ or $(\alpha 1(V))_3$	Cornea, placental membranes, bone, large vessels, hyaline cartilage
VI	$\alpha 1(VI)\ \alpha 2(VI)\ \alpha 3(VI)$	Skin, nucleus pulposus, heart muscle
VII	$(\alpha 1(VII))_3$	Skin, placenta, lung, cartilage, cornea
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
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, ligament
XIII	Unknown	Cetal skin, bone, intestinal mucosa

ที่มา: Friess (1998)

5. การสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการล้างทำความสะอาดวัตถุดิบ เพื่อกำจัดสารอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน เช่น ไขมัน โปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน และแร่ธาตุ แล้วจึงทำการสกัดคอลลาเจนที่มีอยู่ให้ละลายออกมาโดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

5.1 การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายเกลือ (Neutral salt soluble collagen)

คอลลาเจนที่สามารถละลายในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง (1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH 7.4) จะมีปริมาณที่ต่ำหรือไม่มีเลยในเนื้อเยื่อที่เจริญเต็มที่แล้ว อย่างไรก็ตามก็ยังพบคอลลาเจนนี้ในเนื้อเยื่อที่เพิ่งสร้างใหม่ที่ยังไม่มีการสร้างพันธะข้าม สารละลายเกลือจะสกัดโมเลกุลของคอลลาเจนในเนื้อเยื่อที่ไม่มีพันธะข้าม (crosslink) การสกัดจะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ อัตราการเขย่าและปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัดต่อเนื้อเยื่อ การทำบริสุทธิ์คอลลาเจนที่สกัดได้แล้วโดยการทำไดอะไลซ์ การตกตะกอน และการเหวี่ยงแยก คอลลาเจนที่สกัดได้จะประกอบด้วยคอลลาเจน type I และ type III เล็กน้อย

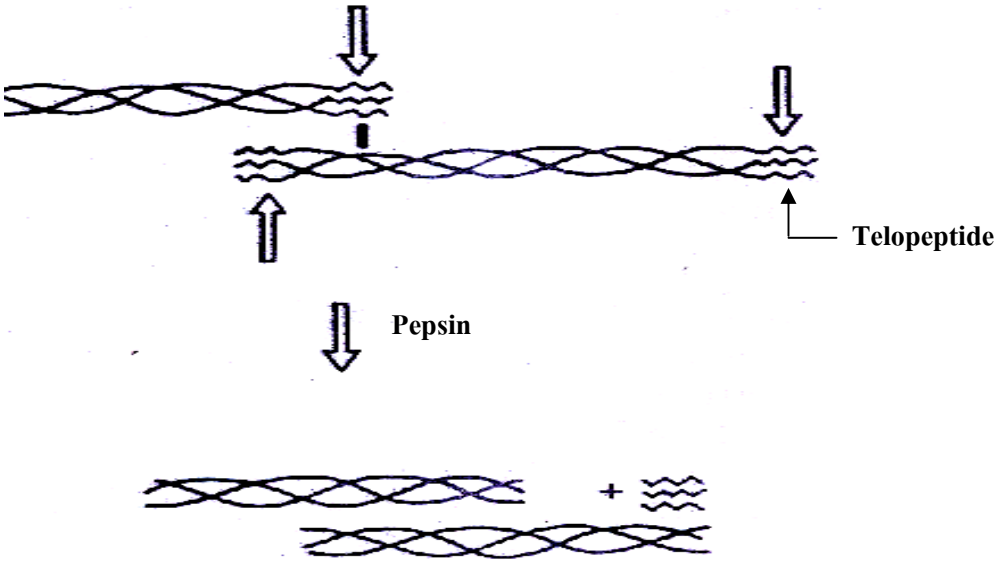
5.2 การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรด (Acid soluble collagen)

คอลลาเจนสามารถละลายในสารละลายกรดเจือจาง เช่น กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5M กรดจะมีประสิทธิภาพในการสกัดคอลลาเจนมากกว่าการใช้สารละลายเกลือ พันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดเจือจางแล้วทำให้ประจุบนโทรโปคอลลาเจนผลักกัน ทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัว (Friess, 1998) คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรดเจือจางจะเป็นคอลลาเจน type I

5.3 การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์เปปซิน (Pepsin soluble collagen) ที่สภาวะความเป็นกรด pH 2.5

การสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้คอลลาเจนที่ยังคงมีบริเวณที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว ที่เรียกว่า ส่วนทีโลเปปไทด์ ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการแพ้ เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Ikada, 2002) ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันปัญหาดังกล่าวจึงใช้เอนไซม์ในการกำจัดทีโลเปปไทด์ ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ คือ เอนไซม์เปปซิน

เนื่องจากมีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยในช่วง pH 2 ซึ่งเป็นช่วงที่ใกล้เคียงกับ pH ที่ใช้ในการสกัด (กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M, pH 2.5) โดยใช้เอนไซม์เปปซินต่อซับสเตรทเท่ากับ 1 ต่อ 10 เนื่องจากเอนไซม์เปปซินจะสามารถทำงานได้ที่ pH ต่ำ (pH 2-3) ซึ่งเอนไซม์เปปซินจะมีประสิทธิภาพในการละลายเส้นใยคอลลาเจน ที่ pH ดังกล่าวเส้นใยคอลลาเจนจะพองตัวทำให้ส่วนทีโลเปปไทด์ ถูกกำจัดได้ง่ายขึ้น (Swan and Torley, 1991) โดยเปปซินจะมีความจำเพาะในการตัดพันธะที่ส่วนปลายของโทรโปคอลลาเจน ทั้งปลาย N- และ C- ออกประมาณ 18 และ 25 หน่วย (amino acid residues) หรือ ส่วนทีโลเปปไทด์ ซึ่งเป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) ค่อนข้างสูง (Bailey and Light, 1989) ทำให้ได้ส่วนของเปปไทด์เล็ก ๆ ละลายอยู่ ส่วนทีโลเปปไทด์จะถูกกำจัดออก แสดงดังภาพที่ 5 ซึ่งมีผลดีคือ ส่วนดังกล่าวจะทำให้เกิดการแพ้ และการสกัดโดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินทำให้ได้คอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าการสกัดโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 5 การตัดพันธะส่วนปลายของโทรโปคอลลาเจนโดยเอนไซม์เปปซิน
ที่มา : Bailey and Light (1989)

Lin and Liu (2004b) ได้ทำการสกัดคอลลาเจนจากหนังตีนไก่ โดยใช้สัดส่วนหนังต่อกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M เป็น 1:10 (w/v) ร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 5% (w/w) โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4 12 18 และ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 36 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 20,000 x g เป็นเวลา 40 นาที ตกตะกอนคอลลาเจนด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 M ละลายตะกอนด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M นำไปไดอะไลซ์ และทำแห้งแบบระเหิด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากหนังตีนไก่ คือ สกัดที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้ปริมาณคอลลาเจนมากที่สุด และเมื่อศึกษาหน่วยย่อยของคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิสูง (18 และ 24 องศาเซลเซียส) พบว่าปริมาณของสาย α ลดลง และมีเปปไทด์สายสั้น ๆ เกิดขึ้น ซึ่งไม่สามารถตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 M เป็นผลให้ปริมาณคอลลาเจนลดลง เนื่องจากการย่อยของเอนไซม์เปปซินและกรดเกิดขึ้นในอัตราที่เร็ว คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิสูงนี้โครงสร้างสามมิติได้ถูกทำลายไปจึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในทางการแพทย์

5.3.1 เอนไซม์เปปซิน

เอนไซม์เปปซินเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในระบบย่อยอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เดี่ยวของกรดอะมิโนจำนวน 321 ตัว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 35.5 kDa (Whitaker, 1994) เป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) ซึ่งจะตัดภายในสายโพลีเปปไทด์ เปปซินมีความจำเพาะในการย่อยพันธะเปปไทด์ที่ต่อกันโดยกรดอะมิโนชนิดอโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน แต่จะไม่ย่อยพันธะเปปไทด์ที่ต่อกันด้วยกรดอะมิโนชนิดวาลีน (Valine) อะลานีน และไกลซีน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์เปปซิน คือ เปปไทด์สายยาว (large peptide fragment) และกรดอะมิโนบางส่วน สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์เปปซิน คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 2 เอนไซม์จะถูกยับยั้งเมื่อ pH สูงกว่า 6 สารยับยั้งเอนไซม์เปปซินได้แก่ pepstatin A, diazoketones, phenylacyl bromine และ aliphatic alcohols เอนไซม์ที่นำมาใช้ส่วนใหญ่สกัดจากเยื่อบุกระเพาะของสัตว์ เช่น สุกร (Bergmeyer, 1984; Devlin, 1997)

5.4 การแยกชนิดของคอลลาเจน

สามารถแยกได้โดยการตกตะกอนสารละลายคอลลาเจนด้วยเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ซึ่งจะได้คอลลาเจนแต่ละชนิดออกมา ดังตารางที่ 3 จากนั้นสามารถทำการแยกชนิดของคอลลาเจนโดยการใช้ column chromatography , HPLC, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), X-ray diffraction (Devictor *et al*., 1995) คอลลาเจนแต่ละชนิดที่แยกได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ตามวัตถุประสงค์ของการใช้งานต่อไป

ในการแยกหน่วยย่อยของคอลลาเจนแต่ละชนิดอาจใช้ column chromatography ร่วมกับ SDS-PAGE ซึ่ง column chromatography จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร (Mizuta *et al,* 2003) โดยพีคที่ออกมาลำดับแรกจะเป็น α1 ลำดับที่ 2 คือ α2 ลำดับของพีคที่เกิดขึ้นจะนำมาเปรียบเทียบกับแถบที่เกิดบน SDS-PAGE ซึ่งโดยทั่วไปคอลลาเจน type I น้ำหนักโมเลกุลของสาย α1ประมาณ 120 kDa α2 ประมาณ 95 kDa ส่วน α3 จะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ α1 จึงทำให้บางครั้งไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน ส่วนสาย β เกิดจากสาย α จำนวน 2 สาย สร้างพันธะกัน จึงทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 2 เท่าของสาย α

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในการตกตะกอนคอลลาเจนชนิดต่าง ๆ

ชนิดคอลลาเจน	ความเข้มข้นของ NaCl (M) ในสารละลาย 0.05M Tris,0.15M NaCl, pH 7.5
I	2-2.6
III	1.6
IV	2.0
V	4.5

ที่มา : Bailey and Light (1998)

6. การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา

เนื่องจากในอุตสาหกรรมการแปรรูปปลาเป็นอุตสาหกรรมที่มีปริมาณสูง ในขั้นตอนการผลิตจึงมีเศษเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก เช่น หนัง เกล็ด ก้าง เป็นต้น ส่วนใหญ่แล้วจะนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ หรือ ทิ้ง นับว่าเป็นการใช้วัตถุดิบอย่างไม่คุ้มค่า และเกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ในอุตสาหกรรมการผลิตคอลลาเจนวัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่ คือ หนังวัวและหนังสุกร (Nagai and Suzuki, 2002) เนื่องจากการระบาดของโรควัวบ้า (bovine spongiform encephalopathy: BSE) ผู้บริโภคส่วนใหญ่จึงวิตกว่าคอลลาเจนที่ได้จากหนังวัวจะมีความไม่ปลอดภัย ส่วนคอลลาเจนที่ได้จากสุกร ไม่สามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารบางชนิดได้ เนื่องจากเหตุผลทางศาสนา (Sadowska *et al*., 2003) ดังนั้นจึงมีการนำหนังปลาที่เหลือจากอุตสาหกรรมการแปรรูปปลามาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ผลิตคอลลาเจนทดแทนหนังวัวและหนังสุกร

เศษเหลือที่ได้จากอุตสาหกรรมการแปรรูปจากปลาที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดคอลลาเจน ได้แก่ หนัง เกล็ด ก้าง เป็นต้น ขั้นตอนการสกัดเริ่มต้นจากการเตรียมวัตถุดิบ โดยการทำความสะอาดนำวัตถุดิบแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 M เพื่อกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous protein) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการกวนตลอดเวลา แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง (Ogawa *et al*., 2004) บางครั้งอาจมีการกำจัดไขมันออกโดยใช้ 10% butyl alcohol แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำเย็น (Kittiphattanabawon *et al*., 2005)

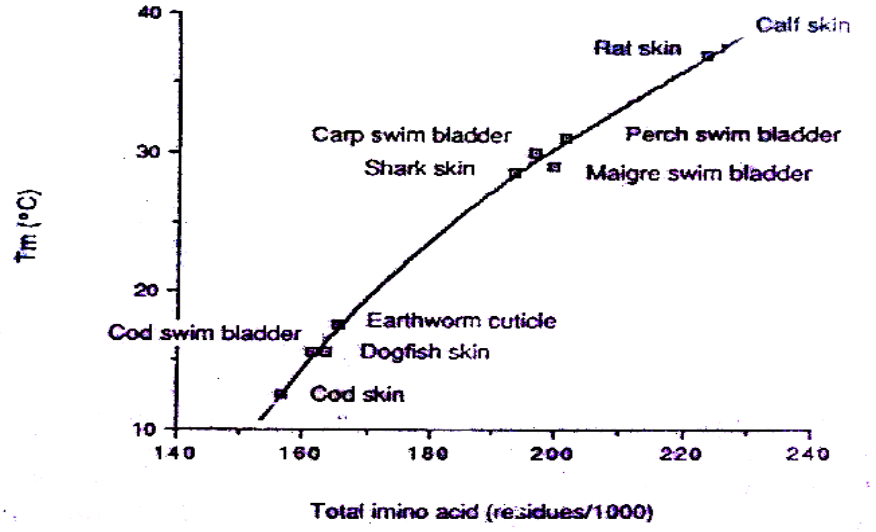
Noitup (2004) นำหนังปลาสีกูดหรือปลากะพงแสม (Silver-line grunt : *Pomadasys kaakan*) ที่ทำความสะอาดแล้วทำแห้งแบบระเหิด (Freeze dry) และปลาทูนา (Albacore tuna : *Thunnus alalunga*) มาสกัดคอลลาเจนโดยตัดหนังเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปั่นผสมกับสารละลายกรดอะซิติก (pH 2.5) ในสัดส่วนของหนังปลา : กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M เท่ากับ 1: 70 ทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเหวี่ยงแยกที่ 30,000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตะกอนส่วนที่เหลือนำกลับไปสกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติกในสภาวะเดิม 3 ครั้ง เติมเอนไซม์เปปซิน (ความเข้มข้น 0.1% w/v) ลงในสารละลายส่วนใสทำการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำมาตกตะกอนคอลลาเจน Type I โดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.9 M แล้วนำไปทำไดอะไลซิส (dialysis) ด้วยสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1M และน้ำปราศจากอิออน (deionized water) จากนั้นจึงนำไปทำแห้งแบบระเหิด เก็บที่อุณหภูมิต่ำ ขั้นตอนการสกัดทั้งหมดจะทำที่อุณหภูมิต่ำคือ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณผลได้ (yield) คอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบระเหิด

เท่ากับ 90 % dry basis คุณสมบัติของคอลลาเจนที่ได้เมื่อทำอิเลคโทรโฟริซิสจะได้แถบโปรตีนบน SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel) ประกอบด้วยสาย α อย่างน้อย 2 สาย คือ α1 (น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120 kD) และ α2 (น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 112 kD) และมีการสร้างพันธะข้ามเกิดขึ้นเพราะมี β (เกิดจากα 2 สายมีพันธะต่อกัน) และ γ (เกิดจาก α 3 สายมีพันธะต่อกัน) คอลลาเจนที่สกัดได้เป็นคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้ส่วนใหญ่ในหนังปลา

Kittiphattanabawon *et al*. (2005) ศึกษาคุณสมบัติของคอลลาเจนที่ละลายในกรด (acid-soluble collagen) จากหนังปลาตาหวาน (bigeye snapper: *Priacanthus tayenus*) ซึ่งเป็นปลาที่อาศัยในเขตร้อน ซึ่งทุกขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจนทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมคอลลาเจนจากหนังปลาเริ่มต้นจากการกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนด้วยสารละลายโซเดียม - ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N ทำการกำจัดไขมันโดยใช้ butyl alcohol ความเข้มข้น 10% แล้วจึงล้างด้วยน้ำเย็น ต่อจากนั้นละลายคอลลาเจนออกจากหนังปลาในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M สัดส่วนหนังปลา : กรด เท่ากับ 1:30 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบาง ส่วนที่เหลืออยู่นำมาสกัดอีกครั้งในสภาวะเดิม แล้วจึงนำเอาสารละลายทั้งหมดที่สกัดได้มาตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.6 M ใน tris(hydroxymethyl) aminomethane ความเข้มข้น 0.05 M, pH 7 นำไปเหวี่ยงแยกที่ 20,000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเอาส่วนที่ตกตะกอนมาละลายด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M และทำการไดอะไลซ์ด้วยสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 M และน้ำกลั่น แล้วจึงทำแห้งแบบระเหิด ปริมาณผลได้คอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบระเหิด เท่ากับ 30.3 % dry basis จากการทดสอบโดยใช้ SDS-PAGE พบว่า คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลามีสาย α 2 สาย ได้แก่ α1 และ α2 และอาจมีสาย α3 แต่เนื่องจาก α3 มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ α1 จึงทำให้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน (Kimura, 1992) จากการทดสอบดังกล่าวแสดงว่าคอลลาเจนจากหนังปลาตาหวานเป็นคอลลาเจน type I ซึ่งจะประกอบด้วยสายของ α1 (I) 2 สาย และ α2 (I) 1 สาย

7. สมบัติความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน

ปริมาณของโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน แสดงดังภาพที่ 6 ซึ่งการเสียสภาพของคอลลาเจนโดยความร้อนในสารละลายวัดโดยการเปลี่ยนแปลงความหนืดหรือค่า optical rotation พบว่าอุณหภูมิในการหลอมละลาย (melting temperature, Tm) ของคอลลาเจนจากสัตว์จะมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิร่างกาย เช่น คอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี Tm ประมาณ 39 องศาเซลเซียส ค่า Tm จะมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมที่สัตว์นั้นอาศัยอยู่ ซึ่งพบว่าคอลลาเจนจากปลาซึ่งอาศัยที่อุณหภูมิต่ำจะมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่ต่ำ เช่นคอลลาเจนจากหนังปลาคอดมีค่า Tm ประมาณ 12 องศาเซลเซียส ความคงตัวของฮีลิกซ์ของแต่ละสายโพลีเปปไทด์ของโทรโปคอลลาเจนขึ้นกับโพรลีนและไฮดรอกซี - โพรลีน ส่วนความคงตัวของโทรโปคอลลาเจนเกี่ยวข้องกับพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ระหว่างโมเลกุล (Stryer, 1975)



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ของปริมาณกรดอิมิโนและความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจนจากสัตว์ชนิดต่าง ๆ

ที่มา: Bailey and Light (1989)

การศึกษาสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่อยู่ในรูปสารละลายเจือจาง ทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาความหนืด birefringence และวิธี differential scanning calorimetry (DSC) ส่วนเส้นใยคอลลาเจนที่อยู่ในรูปที่ไม่ละลาย (insoluble collagen fibres) จะศึกษาโดยวิธีทางกล เช่น วิธี dynamic mechanical analysis (DMA) การใช้กล้องจุลทรรศน์ และวิธี differential scanning calorimetry (Bailey and Light, 1989)

การเปลี่ยนแปลงสถานะของสารสามารถตรวจติดตามได้จากการเปลี่ยนแปลงของระดับพลังงาน ซึ่งได้แก่การดูดและคายความร้อน ปฏิกิริยาที่มีการดูดความร้อนเรียกว่า เอนโดเทอร์มิค (endothermic) ส่วนปฏิกิริยาการคายความร้อนเรียกว่า เอกโซเทอร์มิค (exothermic) สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงสถานะของสารโดยวิธี differential scanning calorimetry ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความไวสูง โปรตีนเมื่อได้รับความร้อนจะมีการดูดความร้อนเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในโมเลกุล คือ มีการทำลายพันธะภายในโมเลกุล ดังนั้นการเสียสภาพของโปรตีนโดยความร้อนจะเป็นปฏิกิริยาเอนโดเทอร์มิค ซึ่งพลังงานที่ใช้ในการสลายพันธะจะแสดงเป็นค่าพลังงานเอนทาลปี (enthalpy) ส่วนอุณหภูมิในการเสียสภาพ (denaturation temperature) หรืออุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด (peak maximum temperature) คือ อุณหภูมิที่โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปร้อยละ 50 (Kilara and Harwalkar, 1996) ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวต่อความร้อนของโปรตีน ได้แก่ pH ซึ่งพบว่าโปรตีนที่อยู่ในสภาวะ pH ที่เป็นกรดหรือด่างมากขึ้น อุณหภูมิในการเสียสภาพจะลดลง เช่น คอลลาเจนที่ pH 4-10 จะมีอุณหภูมิในการเสียสภาพเท่ากับ 61 องศา - เซลเซียส ที่ pH 3 และ 11 อุณหภูมิในการเสียสภาพจะเท่ากับอุณหภูมิห้อง (Carr, 1953) เนื่องมาจากที่ pH ที่มีค่าสูงหรือต่ำมาก จะทำให้โปรตีนเกิดการผลักกันมากขึ้นและเกิดการสลายพันธะไฮโดรเจนและไฮโดรโฟบิก

8. การจับกันของโมเลกุลคอลลาเจน (Collagen self-assembly)

โมเลกุลของโทรโปคอลลาเจนสามารถละลายได้เฉพาะในสารละลายกรด และเมื่อ pH ของสารละลายเปลี่ยนเป็นกลาง จะมีการจับตัวกันเกิดเป็นเส้นใย เกิดเป็นลักษณะฟิล์มและแผ่นที่มีรูพรุนลักษณะคล้ายฟองน้ำ (Ikada, 2002) ซึ่งสามารถนำไปผลิตวัสดุทางการแพทย์ คอลลาเจนจะมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นใยของคอลลาเจน โดยโมเลกุลของคอลลาเจนจะเรียงตัวซ้อนทับกัน เริ่มจากคอลลาเจน 5 โมเลกุลจับกันเป็นวงแกน (inner pentamer core) เรียงต่อกันเป็นสายยาว จากนั้นจึงมีการซ้อนตัวของคอลลาเจนโมเลกุลอื่น ๆ ซ้อนออกมาสู่ภายนอก ทำให้เห็นลักษณะเส้นใยบิดเป็นเกลียวเกิดขึ้น เส้นใยคอลลาเจน (collagen fibril) ที่เกิดขึ้นนี้ สามารถเพิ่ม

ความยาวและขนาดได้ ขึ้นอยู่กับความต้องการของเนื้อเยื่อ โดยในช่วงแรกจะเกิดเป็นเส้นใยยาวก่อนแล้วจึงค่อย ๆ เพิ่มขนาดขึ้น โดยจลศาสตร์ของการจับกัน (kinetic of assembly) วัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ 310 นาโนเมตรของสารละลายคอลลาเจน ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 เป็นระยะที่ค่าการดูดกลืนแสงยังไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งจะมีการเกิดนิวเคลียสของคอลลาเจนไฟบริลขึ้น ระยะที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนอย่างรวดเร็ว เนื่องมาจากการจับกันของคอลลาเจนไฟบริล และระยะที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ เกิดการสร้าง network ของไฟบริล (Veis and George, 1994)

คอลลาเจนจะเกิดการจับตัวกันทันทีเมื่อมีการปรับค่า pH ionic strength และอุณหภูมิของสารละลายให้ใกล้เคียงกับสภาวะภายในเซลล์ (Hulmes, 1992) Noitup (2004) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเร็วในการจับกันของโมเลกุลคอลลาเจน ได้แก่ ความเข้มข้นของคอลลาเจนในสารละลาย (0.25 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) pH ของ 67 mM phosphate buffer (pH 5 6 7 และ8) และอุณหภูมิในการปล่อยให้เกิดการจับตัวกัน (20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส) พบว่า ที่ความเข้มข้นของคอลลาเจน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ pH 6 และปล่อยให้จับตัวกันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คอลลาเจนมีอัตราเร็วในการจับตัวกันสูงที่สุด เนื่องจากที่ pH 6 เป็นpH ที่ใกล้เคียงกับ pI (Isoelectric pH) ของคอลลาเจนจึงทำให้คอลลาเจนเกิดการจับตัวกันได้ดี และอุณหภูมิในการปล่อยให้จับตัวกันนั้นควรต่ำกว่าอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดได้ (อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 33.8 องศาเซลเซียส)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

วัตถุดิบและสารเคมีสำหรับการสกัดคอลลาเจน

1. หนังปลาสีถูดหรือปลากะพงแสม (silver-line grunt : *Pomadasys kaakan*) จากบริษัทยูเนี่ยนโฟร์สเซ่นส์ โปรดักส์ จำกัด ประเทศไทย
2. เอนไซม์เปปซิน (EC 3.4.23.1, จากเยื่อบุกระเพาะอาหารสุกร) activity 936 units/mg protein จากบริษัท Sigma Chemicals
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ยี่ห้อ Analar จากบริษัท BDH Laboratory Supplies
4. กรดอะซิติก ยี่ห้อ Merck จากบริษัท Merck KGaA
5. โซเดียมคลอไรด์ ยี่ห้อ UNIVAR จากบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals จำกัด
6. ถุงไดอะไลซิส ยี่ห้อ Cellu Sep (MWCO 12,000-14,000) จากบริษัท Membrane Filtration Products จำกัด

สารเคมีสำหรับทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE

1. คอลลาเจน Type I จากหนังลูกวัว (Calf skin acid soluble collagen type I, ICN 9007-34-5) จากบริษัท ICN Biomedical
2. โปรตีนมาตรฐาน (high molecular weight marker) จากบริษัท Sigma Chemicals
3. โปรตีนมาตรฐาน (molecular weight markers) จากบริษัท Amersham Biosciences
4. Acrylamide PAGE ยี่ห้อ Plus One จากบริษัท Amersham Biosciences
5. Methylenebisacrylamide ยี่ห้อ Plus One จากบริษัท Amersham Biosciences
6. Glycine ยี่ห้อ Plus One จากบริษัท Amersham Biosciences
7. Mercaptoethanol ยี่ห้อ Plus One จากบริษัท Amersham Biosciences
8. Sodium Dodecyl Sulfate (Sodium Lauryl Sulfate, SDS) จากบริษัท USB Corporation
9. Coomassie brilliant blue R-250 จากบริษัท USB Corporation
10. Ammonium persulphate จากบริษัท USB Corporation
11. N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine (TEMED) จากบริษัท USB Corporation

12. Bromophenol blue จากบริษัท Ajax Finechem

13. Tris (hydroxymethyl aminomethane) ยี่ห้อTrizma®bass puriss จากบริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien

14. Glycerol ยี่ห้อ UNIVAR จากบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals จำกัด

สารเคมีสำหรับศึกษาการจับตัวกันของคอลลาเจน

1. Sodium dihydrogen orthophosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$) ยี่ห้อ UNIVAR จากบริษัท Ajex Finechem

2. di-sodium hydrogen orthophosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ยี่ห้อ UNIVAR จากบริษัท Ajex Finechem

3. สีย้อม FITC (fluorescein-5-isothiocyanate) ยี่ห้อ Invitrogen จากบริษัท Molecular Probes

4. Sodium bicarbonate ยี่ห้อ Merck จากบริษัท Merck KGaA

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องปั่นผสม (Waring blender) จากบริษัท Waring Product division

2. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall RC 5C Plus

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

4. เครื่องวัดความหนืด (viscometer) รุ่น RVT ยี่ห้อ Brookfield จากบริษัท Brookfield Engineering Lab.

5. เครื่องอิเลคโทรโฟริซิส รุ่น Mini-Protean II Electrophoresis Cell และ Power supply จากบริษัท Bio-Rad Laboratory

6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ BS-11 จากบริษัท Jeio Tech จำกัด

7. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectro 22 จากบริษัท Labomed Inc.

8. กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal laser scanning microscope รุ่น Axio Imager MI จากบริษัท Carl Zeiss Pte จำกัด

9. เครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC) ยี่ห้อ Perkin Elmer

10. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Microcomputer pH-vision 6071 จากบริษัท Jenco Electronics จำกัด

วิธีการ

1. ศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกรดต่อหนังปลาในการสกัดคอลลาเจน

1.1 ขั้นตอนการเตรียมคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูด

หนังปลาสีกูด ขนาดลำตัวยาวประมาณ 30-45 เซนติเมตร ซึ่งเป็นเศษเหลือจากการผลิตปลาแล่แช่เยือกแข็ง นำมาล้างทำความสะอาด ขูดเอาส่วนของเนื้อและเกล็ดที่ติดมาออก แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ทำการสกัดคอลลาเจนโดยปรับปรุงจากวิธีการของ Noitup (2004) โดยใช้วัตถุดิบเป็นหนังปลาสดแทนหนังปลาแห้ง รวมทั้งขั้นตอนการสกัดใช้กรดอะซิติกร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ทำการสกัดเพียงรอบเดียว โดยนำหนังปลาสดมาปั่นผสมกับสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M (pH 2.5) และ เอนไซม์เปปซิน ความเข้มข้น 0.1% (w/v) ในสัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก (กรัมต่อมิลลิลิตร) คือ 1:10 1:15 1:20 1:25 โดยใช้เครื่องปั่นผสมที่ความเร็วระดับ 3 เป็นเวลา 3 นาที ทำการกวนตลอดเวลา สุ่มตัวอย่างไปวัดความหนืดของสารละลายทุก ๆ ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 1.2 แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 x g เป็นเวลา 30 นาที สารละลายส่วนบนที่ได้นำไปตกตะกอนแยกคอลลาเจนโดยปรับสารละลายให้มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.9 M แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ตะกอนที่ได้ละลายในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M (สัดส่วนตะกอนต่อกรดเท่ากับ 1:4) แล้วนำไปทำไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่นและน้ำปราศจากอิออน จากนั้นจึงนำไปทำแห้งแบบระเหิด โดยขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจนทำที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส คิดปริมาณผลได้ของคอลลาเจนตามวิธีการในข้อ 1.3 และศึกษาหน่วยย่อยของคอลลาเจนตามวิธีในข้อ 1.4

1.2 ความหนืดของสารละลายขณะทำการสกัดคอลลาเจน

วัดความหนืดของสารละลายโดยใช้เครื่องวัดความหนืด หัวเข็มเบอร์ 2 ความเร็วรอบ 10 รอบต่อนาที สุ่มตัวอย่างไปวัดความหนืดของสารละลายทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้ตัวอย่าง 300 มิลลิลิตร

1.3 ปริมาณผลได้ของคอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบระเหิด

โดยสัดส่วนที่เหมาะสมจะดูจากปริมาณผลได้มากที่สุด โดยคำนวณจากสมการต่อไปนี้

ปริมาณผลได้ หรือ Yield (mg/g skin dry basis) = $\frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนหลังการทำแห้ง (กรัม)} \times 1000}{\text{น้ำหนักหนังปลาสด (ที่หักลบความชื้น) เริ่มต้น (กรัม)}}$

1.4 ศึกษาหน่วยย่อยของคอลลาเจนโดยการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

ศึกษาหน่วยย่อยของคอลลาเจนที่สกัดได้เมื่อใช้หนังปลาต่อกรดแต่ละสัดส่วน คอลลาเจน Type I จากหนังลูกวัว และคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดที่สกัดโดย Noitup (2004) (ซึ่งสกัดจากหนังแห้งโดยใช้กรดตามด้วยเอนไซม์ที่ 4 องศาเซลเซียส) โดยการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE (ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli, 1970) โดยเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย SDS ความเข้มข้น 5% และมี 2-mercaptoethanol ความเข้มข้น 5% เป็นตัวรีดิวซ์ (สลายพันธะไดซัลไฟด์) ใส่ตัวอย่าง 5 µl ลงในแต่ละหลุมและทำอิเลคโทรโฟริซิสใน 7.5% separating gel และ 4% stacking gel และย้อมสีด้วย Coomassie blue R250 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเปรียบเทียบกับ high molecular weight marker น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 36-205 kDa ซึ่งประกอบด้วย rabbit myosin (205 kDa), E.coli β-galactosidase (116 kDa), rabbit phosphorylase (97kDa), rabbit fructose-6-phosphate kinase (84 kDa), bovine albumin (66 kDa), bovin glutamic dehydrogenase (55 kDa), ovalbumin (45 kDa), rabbit glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa) วิธีการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE แสดงดังภาคผนวก ข

2. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจน

ทำการสกัดคอลลาเจนตามวิธีการในข้อ 1.1 และใช้สัดส่วนหนังปลาสดต่อกรดที่เหมาะสมจากข้อ 1 โดยสกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส วัดความหนืดของสารละลายตามวิธีในข้อ 1.2 โดยใช้ หัวเข็มเบอร์ 5 ความเร็วรอบ 5 รอบต่อนาที สำหรับอุณหภูมิ 4 10 20 องศาเซลเซียส และ ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที สำหรับอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (เนื่องจากความหนืดของสารละลายต่ำมาก) วัดปริมาณผลได้ของคอลลาเจนตามวิธีการในข้อ 1.3 และศึกษาหน่วยย่อยของคอลลาเจนตามวิธีในข้อ 1.4 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเปรียบเทียบกับ molecular weight markers น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 – 250 kDa ซึ่งประกอบด้วย recombinant proteins ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลดังนี้ 10 15 25 30 35 50 75 105 160 และ 250 kDa และหาสัดส่วนความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้หลังการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE ด้วยโปรแกรม SigmaGel (SPSS Science, Chicaco, IL, USA) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนเลือกจากปริมาณผลได้ที่มากที่สุดหลังการทำแห้งแบบระเหิด

3. ศึกษาสมบัติความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน

เตรียมตัวอย่างคอลลาเจนสำหรับศึกษาความคงตัวต่อความร้อน ดัดแปลงจากวิธีของ Rochdi *et al.*(2000) และ Komsa-Penkova *et al.* (1999) โดยนำคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 10 20 28 องศาเซลเซียส คอลลาเจนที่สกัดโดย Noitup (2004) และคอลลาเจนจากหนังลูกวัว เติมน้ำปราศจากอิออนเข้าไปในตัวอย่าง โดยสัดส่วนตัวอย่างต่อน้ำเท่ากับ 1:40 (w/v) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน ต่อจากนั้นชั่งน้ำหนักใส่ใน stainless steel pan ประมาณ 15 มิลลิกรัม ปิด pan ให้สนิท แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน นำไปวิเคราะห์ความคงตัวต่อความร้อนโดยใช้เครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) โดยใช้อัตราในการให้ความร้อน (heating rate) เท่ากับ 1 องศาเซลเซียสต่อนาที ในช่วงอุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส ค่าที่ใช้ในการศึกษาความคงตัวต่อความร้อน ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้นที่มีการดูดกลืนความร้อนในการเสียสภาพ (onset temperature, To) อุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด (peak maximum temperature, Tp) และอุณหภูมิสุดท้ายในการดูดกลืนความร้อน (recovery temperature, Tr)

4. ศึกษาการจับตัวกันของคอลลาเจน (Collagen self-assembly)

4.1 อัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจน (Rate of collagen self-assembly)

ศึกษาอัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจน โดยดัดแปลงจากวิธีของ Noitup (2004) คอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้งแบบระเหิดจากข้อ 2 นำมาละลายด้วยสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 M ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปไดอะไลซิสด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 67 mM pH 6 เมื่อ pH ของสารละลายได้ตามต้องการ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยสารละลายส่วนใสให้เกิดการจับตัวกันใหม่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งติดตามผลการเปลี่ยนแปลงโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร จนกระทั่งสารละลายแยกชั้นและไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้

4.2 โครงสร้างของคอลลาเจนเมตริกซ์ โดยใช้กล้อง confocal laser scanning microscope

สารละลายส่วนใสของคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปล่อยให้จับตัวกันใหม่เป็นเวลา 4 และ 5 ชั่วโมง และคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จับตัวกันใหม่ 4 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 x g เป็นเวลา 10 นาที คอลลาเจนเมตริกซ์ที่ได้ย้อมสีตามวิธีของ Wong *et al*.(1997) โดยเตรียมสารละลายของ FITC (fluorescein-5-isothiocyanate) 30 มิลลิกรัมในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.5 M ทำการเจือจางสารละลายสี 100 เท่าก่อนนำไปใช้ แช่คอลลาเจนเมตริกซ์ในสารละลายสีในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินโดยใช้น้ำกลั่นไหลผ่านตัวอย่างนาน 30 วินาที นำชิ้นตัวอย่างวางบนสไลด์แก้วซับน้ำให้แห้ง ปิดทับชิ้นตัวอย่างด้วยกระจกปิดสไลด์ เก็บตัวอย่างไม่ให้ถูกแสง ศึกษาโครงสร้างโดยกล้อง confocal laser scanning microscope หรือ CLSM ใช้แหล่งกำเนิดแสง HeNe laser ความยาวคลื่นในการกระตุ้น (excitation wavelength) 488 นาโนเมตร ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 และ 100 เท่าของเลนส์วัตถุ ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยคอลลาเจนที่กำลังขยาย 100 เท่าของเลนส์วัตถุ จำนวน 50 เส้น ในพื้นที่ขนาด 0.6 ตารางเซนติเมตร

5. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ตามการทดลองแบบสุ่มตลอด (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

6. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

7. ระยะเวลาทำการวิจัย

การทดลองเริ่มเดือนมีนาคม 2548 สิ้นสุดเดือนกุมภาพันธ์ 2550

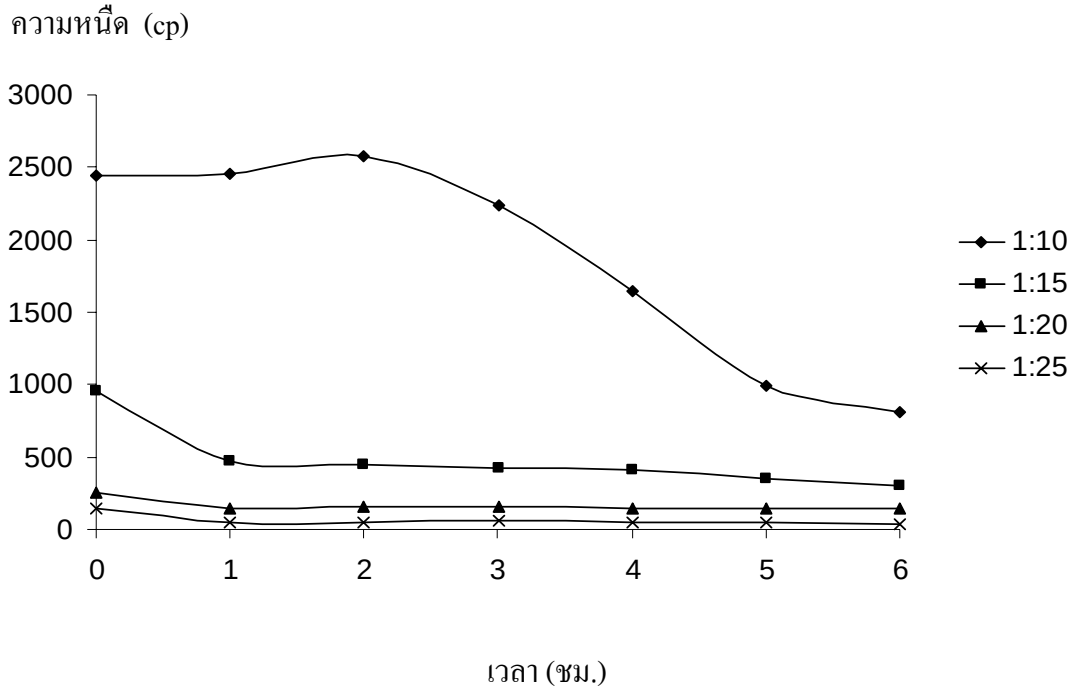
ผลและวิจารณ์

1. ศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของกรดต่อหนังปลาในการสกัดคอลลาเจน

1.1 ความหนืดของสารละลายขณะทำการสกัดคอลลาเจน

ภาพที่ 7 แสดงความหนืดของสารละลาย พบว่า ที่สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก เท่ากับ 1:10 (w/v) ความหนืดของสารละลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อสกัดนาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 - 5 ชั่วโมง และลดลงเล็กน้อยเมื่อย่อยนาน 6 ชั่วโมง ส่วนที่สัดส่วน 1:15 1:20 และ 1:25 ความหนืดของสารละลายจะลดลงในช่วง 0 – 1 ชั่วโมงของการสกัด โดยจะเห็นการลดลงไม่มากนักในสัดส่วน 1:20 และ 1:25 หลังจาก 1 ชั่วโมงความหนืดจะค่อนข้างคงที่ ค่าความหนืดของสารละลาย แสดงดังตารางที่ 4

การเพิ่มของความหนืดเกิดจาก หนังปลาเมื่ออยู่ในสารละลายกรด pH 2-3 จะเกิดการพองตัว ช่องว่างระหว่างเส้นใยคอลลาเจนจะขยายกว้างขึ้น ทำให้เปปซินเข้าไปย่อยส่วนทีโลเปปไทด์ของโทรโปคอลลาเจนได้ง่ายขึ้น จึงเกิดการละลายของคอลลาเจนอยู่ในสารละลาย (Swan and Torley, 1991) ทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดกรดจะตัดพันธะไฮโดรเจนในโมเลกุลของคอลลาเจน (Gustavson, 1956) ทำให้สายฮีลิกซ์แยกออกจากกันและเปลี่ยนเกลียวเป็นแบบเกลียวที่ไม่เป็นระเบียบ (random chains) (Bailey and Light, 1989) ทำให้ได้โพลีเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ส่งผลให้ความหนืดลดลง แต่สารละลาย 1:20 และ 1:25 จะเห็นการเปลี่ยนแปลงความหนืดน้อย เนื่องจากหนัง 1 ส่วน เติมสารละลายกรดค่อนข้างมาก จึงเกิดการเจือจางของสารละลายคอลลาเจนที่สกัดได้ นอกจากนั้นปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ต่อหนัง 1 ส่วนมีปริมาณมากขึ้นด้วย การย่อยที่ 28 องศาเซลเซียส เกิดเร็วขึ้นทำให้ได้โพลีเปปไทด์โมเลกุลเล็กในเวลาสั้น ส่งผลให้ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของความหนืดของสารละลาย ในการทดลอง พบว่า ถ้าใช้สัดส่วนที่น้อยกว่า 1:10 จะได้สารละลายที่ข้นหนืดมาก การกวนหรือผสมด้วยอุปกรณ์ในระดับการทดลองทำได้ไม่ดี



ภาพที่ 7 ความหนืดของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ 28 องศาเซลเซียส

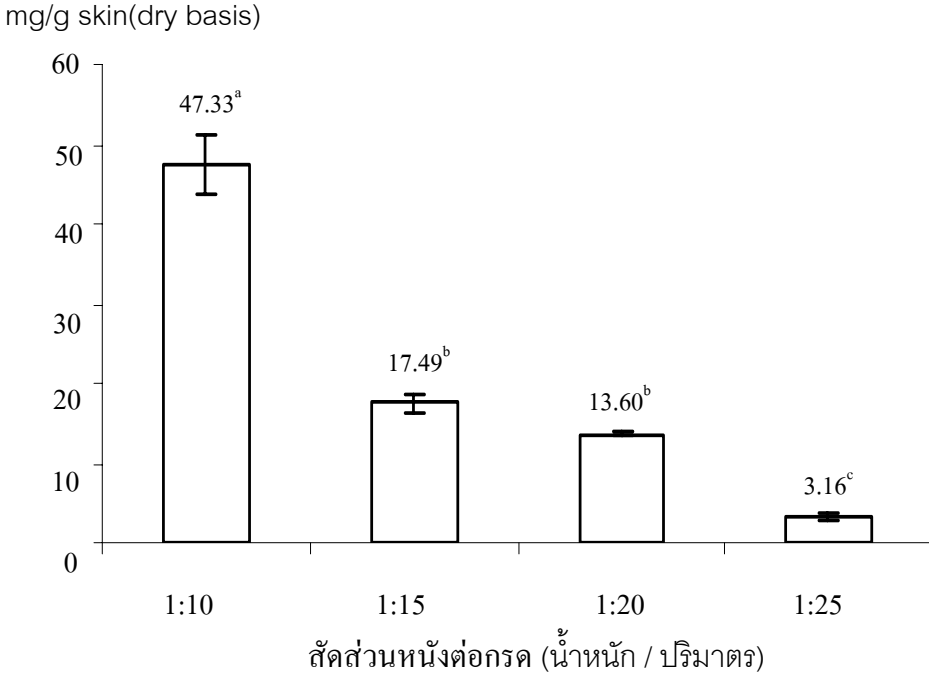
ตารางที่ 4 ค่าความหนืด (cp) ของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง

สัดส่วนหนังต่อกรด	เวลา (ชั่วโมง)						
	0	1	2	3	4	5	6
1:10	2440.0±20.0	2453.3±41.6	2573.3±40.0	2240.0±40.0	1646.6±23.0	986.6±23.9	813.3±23.0
1:15	960.0±80.0	473.33±11.5	446.6±0.0	420.0±0.0	416.0±21.1	346.6±11.5	300.0±0.0
1:20	253.3±11.5	140.0±0.0	160.0±0.0	160.0±0.0	146.6±11.5	146.6±11.5	140.0±0.0
1:25	140.0±0.0	53.3±11.5	52.0±6.9	56.0±6.9	53.3±11.5	46.6±11.5	40.0±0.0

หมายเหตุ ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.2 ปริมาณผลได้ของคอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบระเหิด

วัดปริมาณผลได้ของคอลลาเจน โดยนำสารละลายคอลลาเจนที่สกัดได้มาตกตะกอนโดยปรับสารละลายให้มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.9M แยกตะกอนโปรตีนไปทำแห้งแบบระเหิด เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยสัดส่วนหนังต่อกรด 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 ซึ่งพบว่า 1:10 ให้ผลได้สูงที่สุด คือ 47.33 มิลลิกรัมต่อกรัมหนังปลาสดที่หักลบความชื้นแล้ว แสดงให้เห็นว่าขณะทำการสกัดนั้นสารละลายจากการสกัดที่มีความหนืดสูง (สัดส่วน 1:10) ประกอบด้วยสายยาวของโพลีเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลสูง ซึ่งตกตะกอนในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 M pH 2.5 จำนวนมากกว่าสารละลาย 1:15 1:20 และ 1:25 ซึ่งความหนืดต่ำ ผลได้ของคอลลาเจนจากการสกัดด้วยสารละลาย 1:15 1:20 และ 1:25 มีค่าเท่ากับ 17.49 16.60 และ 3.16 มิลลิกรัมต่อกรัมหนังปลาสดที่หักลบความชื้นแล้ว ตามลำดับ แสดงในภาพที่ 8 ดังนั้นสัดส่วนหนังต่อกรดอะซิติกที่เหมาะสมที่สุดซึ่งให้ปริมาณผลได้ที่มากที่สุดหลังการสกัดนาน 6 ชั่วโมง ที่ 28 องศาเซลเซียส คือ 1:10 (w/v)

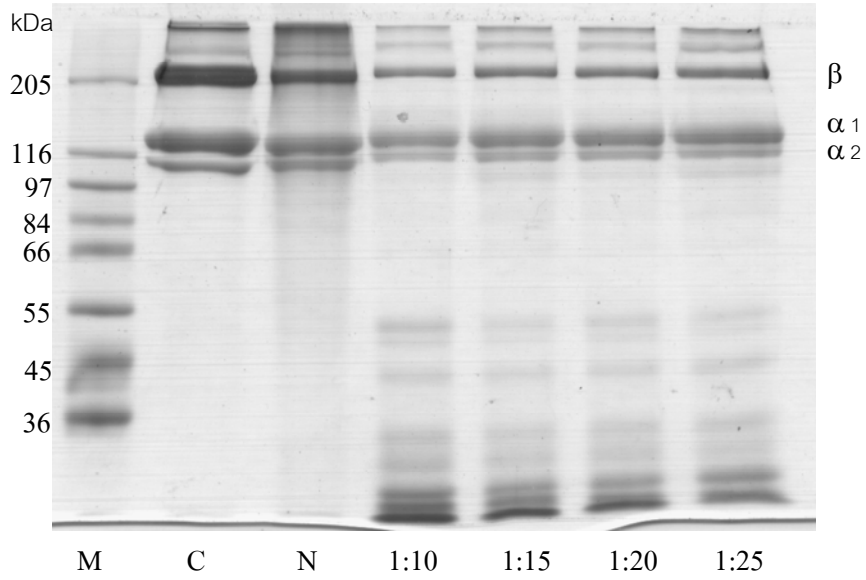


ภาพที่ 8 ปริมาณผลได้คอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบระเหิดเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ 28 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ อักษร a b และ c ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

1.3 ลักษณะของคอลลาเจนจากการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE

ภาพที่ 9 การสกัดหนังปลาด้วยกรดและเอนไซม์ที่สัดส่วนหนังต่อกรด 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 (w/v) แล้วตกตะกอนคอลลาเจนโดยปรับให้สารละลายมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.9 M พบว่า คอลลาเจนที่ได้เป็นคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับคอลลาเจนจากหนังลูกวัว ประกอบด้วยสาย α1 (135 kDa) จำนวน 2 สายและสาย α2 (120 kDa) จำนวน 1 สาย นอกจากนั้นการสกัดคอลลาเจนที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ซึ่งไม่พบในการสกัดที่ 4 องศาเซลเซียส ของ Noitup (2004) เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิที่สูงในการสกัดทำให้เกิดการย่อยคอลลาเจนโดยกรดและเอนไซม์เปปซินจนได้เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กซึ่งมีขนาดเล็กกว่า 55 kDa

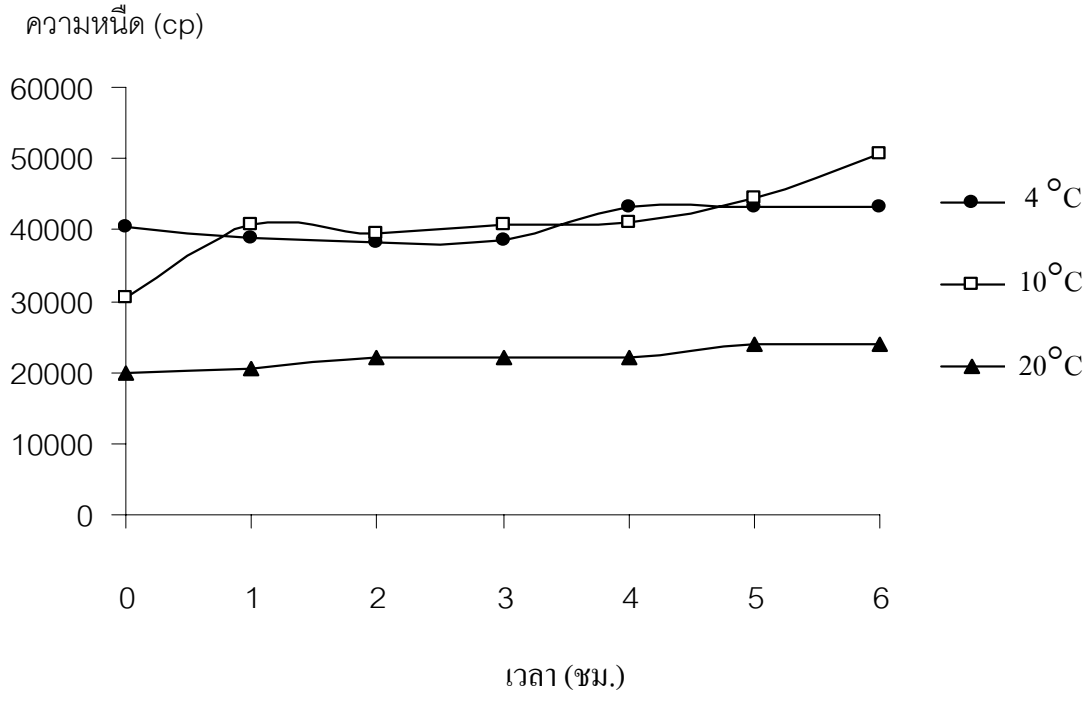


ภาพที่ 9 ลักษณะของคอลลาเจนบน 7.5% SDS-PAGE M: standard marker proteins; C: calf skin collagen; N: คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดหนังปลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของ Noitup (2004) 1:10 1:15 1:20 1:25 คือ คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดหนังปลาสดด้วยกรดและเอนไซม์เปปซิน (0.1% w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ 28 องศาเซลเซียส โดยใช้สัดส่วนหนังต่อกรดดังตัวเลขที่กำกับ

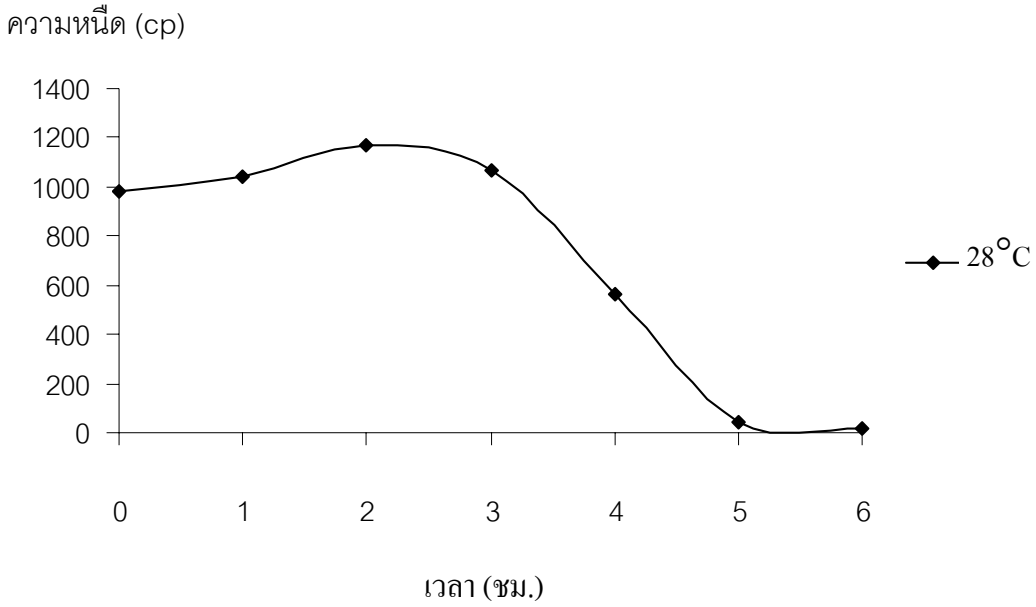
2. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจน

2.1 ความหนืดของสารละลายคอลลาเจน

เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง พบว่าความหนืดของสารละลายคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 4 20 และ 28 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (แสดงดังภาพที่ 10 และ 11) อุณหภูมิส่งผลต่ออัตราการย่อยโปรตีนของกรดและเอนไซม์ (Lin and Liu, 2006b) กล่าวคือ ที่อุณหภูมิต่ำอัตราการย่อยจะต่ำกว่าที่อุณหภูมิสูง ทำให้การสกัดที่อุณหภูมิต่ำจะค่อย ๆ มีคอลลาเจนละลายออกมาในสารละลาย ทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ดังนั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความหนืดของสารละลายจะเพิ่มขึ้นช้ากว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดเป็น 28 องศาเซลเซียส ความหนืดของสารละลายจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว เนื่องมาจากเกิดการย่อยโดยกรดและเอนไซม์เปปซินอย่างรวดเร็วทำให้ได้เปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีการอุ้มน้ำและการพองตัวน้อย จึงทำให้ความหนืดของสารละลายต่ำมาก ค่าความหนืดของสารละลายแสดงดังตารางที่ 5



ภาพที่ 10 ความหนืดของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (4 10 และ 20 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง



ภาพที่ 11 ความหนืดของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง

ตารางที่ 5 ค่าความหนืด (cp) ของสารละลายจากการสกัดคอลลาเจนเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง

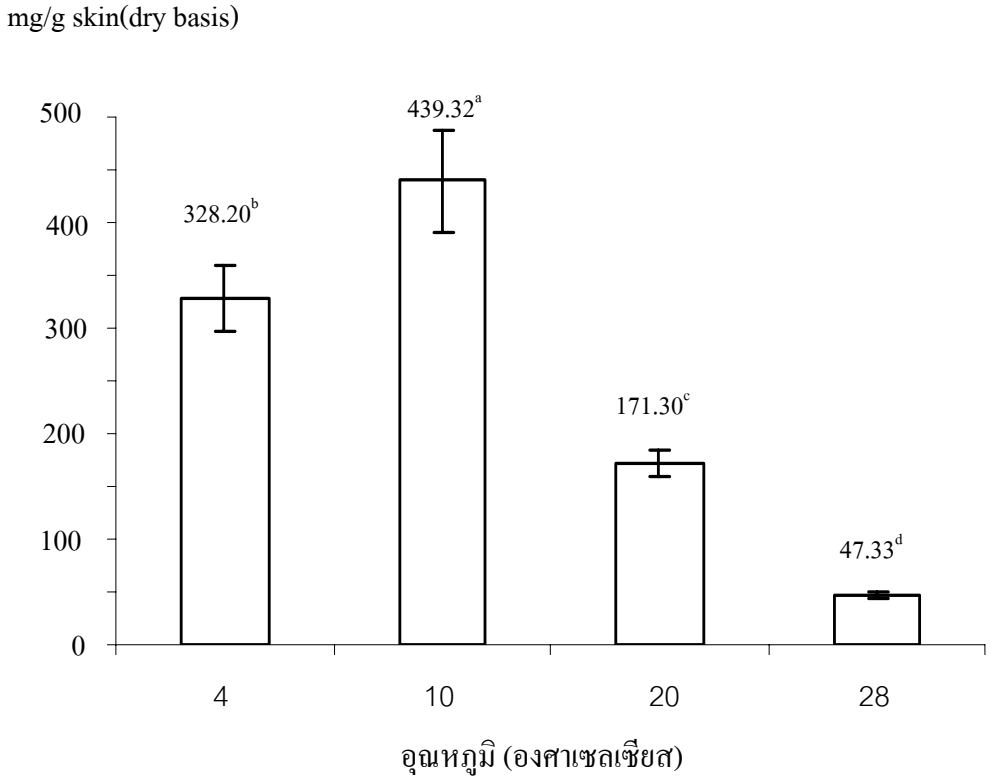
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)						
	0	1	2	3	4	5	6
4	40400.0±565.6	38800.0±1131.3	38220.0±4780.0	38400.0±3394.1	43200.0±2262.7	43200.0±2262	43200±2262.7
10	30400.0±3959.7	40600.0±1979.8	39400.0±4242.6	40800.0±3919.5	40900.0±3252.6	44600.0±3202.4	50600.0±4030.8
20	20000.0±2828.4	20400.0±2545.5	22200.0±2828.4	22100.0±2707.1	22200.0±2828.4	23800.0±2242.6	23800.0±2808.3
28	980.0±141.4	1040.0±169.7	1170±212.1	1070±183.8	560±169.7	40±0.0	20±0.0

หมายเหตุ ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.2 ปริมาณผลได้ของคอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบระเหิด

คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้ปริมาณผลได้มากที่สุด คือ 439.32 มิลลิกรัมต่อกรัมหนังปลาสดที่หักลบความชื้นแล้ว ซึ่งมากกว่าที่ 4 20 และ 28 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ดังแสดงในภาพที่ 12) การสกัดที่ 28 องศาเซลเซียส มีคอลลาเจนที่ตกตะกอนโดยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 M ปริมาณน้อยที่สุด เนื่องมาจากในสารละลายมีเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่ไม่ตกตะกอน ซึ่งเป็นผลจากการย่อยสลายที่สภาวะที่มีอัตราเร็วในการย่อยสูง โดยการย่อยที่ 4 และ 10 องศาเซลเซียส จะควบคุมอัตราเร็วในการสกัดได้ดีกว่าเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง และคงเหลือเปปไทด์ที่ตกตะกอนแยกด้วยโซเดียม - คลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 M ได้มากกว่าที่อุณหภูมิสูง (20 และ 28 องศาเซลเซียส)

ผลจากการทดลองนี้สอดคล้องกับ Lin and Liu (2006b) ได้ทำการสกัดคอลลาเจนจากหนังตีนไก่โดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่อุณหภูมิ 4-24 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการสกัด 24-72 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้ปริมาณคอลลาเจนมากที่สุด แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะได้ปริมาณคอลลาเจนลดลงเนื่องจากการย่อยของเอนไซม์เปปซินและกรดทำให้ได้เปปไทด์สายสั้น ๆ ซึ่งไม่สามารถตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 M อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณผลได้มากที่สุดและยังคงมีเศษหนังที่เหลือจากการสกัด 544.60 มิลลิกรัมต่อกรัมหนังปลาสดที่หักลบความชื้นแล้ว สามารถนำไปสกัดซ้ำได้อีก ซึ่งจะทำให้มีปริมาณผลได้สูงขึ้น



ภาพที่ 12 ปริมาณผลได้คอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบระเหิดเมื่อใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 สกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ (4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง

หมายเหตุ อักษร a b c และ d ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2.3 ศึกษาลักษณะของคอลลาเจนโดยการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE

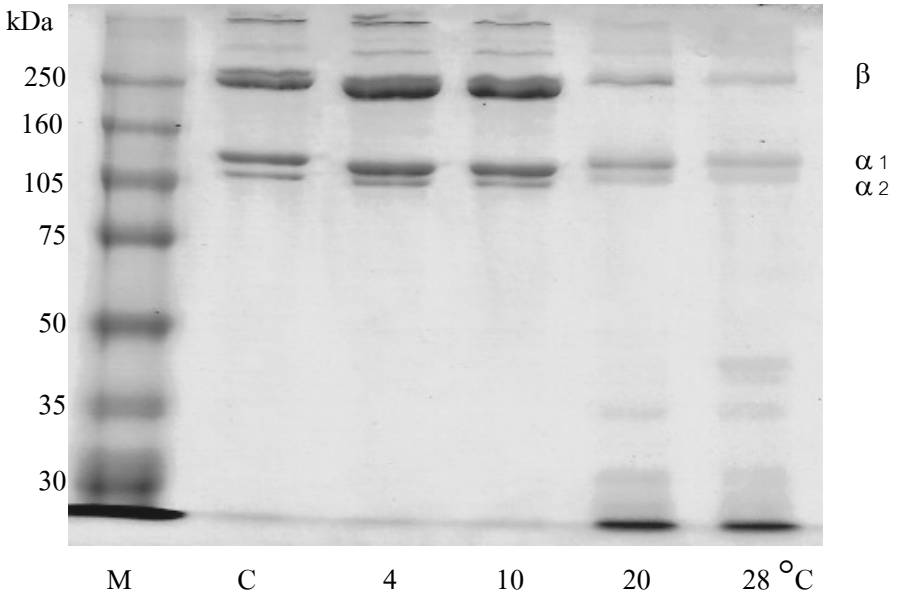
การศึกษาขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนที่ได้ พบว่า คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส มีลักษณะไม่แตกต่างจากคอลลาเจนที่ได้จากหนังวัว ซึ่งประกอบด้วยสาย $\alpha 1$ $\alpha 2$ และ β แต่คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดที่อุณหภูมิ 20 และ 28 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยสาย $\alpha 1$ $\alpha 2$ β และเปปไทด์โมเลกุลเล็กกว่า 50 kDa ดังภาพที่ 13 การเกิดเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 50 kDa เป็นผลจากเอนไซม์เปปซินซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยที่ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 20 และ 28 องศาเซลเซียส จึงทำให้การทำงานของเอนไซม์เปปซินทำงานได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (4 และ 10 องศาเซลเซียส) ดังนั้นในเวลา 6 ชั่วโมง จึงเกิดการย่อยจนได้เปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก การเกิดปฏิกิริยาสลายพันธะระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจนโดยกรดก็เกิดได้ดีและเร็วที่อุณหภูมิสูง ซึ่งกรดทำให้หนังปลาและเส้นใยคอลลาเจนพองตัว ทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยได้ดีขึ้น

เมื่อศึกษาสัดส่วนของความเข้มของแถบโปรตีน พบว่า คอลลาเจนจากหนังวัว คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยสาย γ β และ α ที่มากกว่าคอลลาเจนที่สกัดที่ 20 และ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่พบสาย γ แต่จะพบเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าสาย α อยู่เป็นจำนวนมาก (แสดงดังตารางที่ 6) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดที่อุณหภูมิสูงจะมีการย่อยสาย γ β และ α ที่รวดเร็วกว่าการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้เกิดเป็นเปปไทด์ขนาดโมเลกุลเล็ก

Lee *et al.* (2001) พบว่าคอลลาเจนที่นำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ คอลลาเจนจะต้องยังคงรักษาโครงสร้างสามมิติอยู่ ซึ่งการสกัดที่อุณหภูมิสูง (20 และ 28 องศาเซลเซียส) โครงสร้างดังกล่าวได้ถูกทำลายไปบ้างอาจไม่เหมาะกับการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

คอลลาเจนที่นำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร โดยเฉพาะการผสมในเครื่องดื่มต่างๆ ควรเป็นคอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ ซึ่งละลายได้ง่าย การสกัดคอลลาเจนจึงน่าจะใช้อุณหภูมิสูงและศึกษาสภาวะในการสกัดเพื่อให้ได้ขนาดโมเลกุลคอลลาเจนตามต้องการ

เป็นที่น่าสังเกตว่าความเข้มของแถบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังลูกวัวและคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสในภาพที่ 9 จะมีความเข้มที่มากกว่าในภาพที่ 13 ทั้ง ๆ ที่เตรียมตัวอย่างตามวิธีการเดียวกัน ความแตกต่างดังกล่าวนี้อาจเนื่องมาจากวันที่ทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาทำอิเลคโทรโฟริซิสนั้นมีความชื้นในบรรยากาศสูงมาก ซึ่งตัวอย่างมีลักษณะที่แห้งและมีความสามารถในการดูดความชื้นได้ดี จึงทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างลดลง



ภาพที่ 13 ลักษณะของคอลลาเจนบน 7.5% SDS-PAGE สกัดคอลลาเจนโดยใช้สัดส่วนหนังปลาต่อกรดอะซิติก 1:10 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ในทุก ๆ ตัวอย่าง (M: standard marker proteins; C: calf skin collagen)

ตารางที่ 6 สัดส่วนความเข้มของแถบโปรตีนของหน่วยย่อยของคอลลาเจน

หน่วยย่อย	Calf	อุณหภูมิที่สกัดคอลลาเจน			
		4°C	10°C	20°C	28°C
γ	0.096 ±0.015	0.045±0.017	0.039±0.016	-	-
β	0.512±0.031	0.566±0.018	0.561±0.020	0.132±0.013	0.033±0.010
α	0.392±0.045	0.389±0.023	0.400±0.034	0.254±0.065	0.177±0.055
น้อยกว่า50 kDa	-	-	-	0.614±0.072	0.790±0.059
รวม	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- คือ พบในปริมาณน้อยมาก

3. สมบัติความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน

จากการศึกษาสมบัติความคงตัวต่อความร้อนโดยวิธี differential scanning calorimetry พบว่า คอลลาเจนที่สกัดที่ 4 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิในการเสียสภาพสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดที่ 10 องศาเซลเซียส (39.5 และ 37.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ) แสดงว่าคอลลาเจนที่สกัดที่ 4 องศาเซลเซียส มีความคงทนต่อความร้อนดีกว่าคอลลาเจนที่สกัดที่ 10 องศาเซลเซียส หรือกล่าวว่าคอลลาเจนที่สกัดที่ 4 องศาเซลเซียส ยังคงมีพันธะเชื่อมภายใน และระหว่างสายโมเลกุลของคอลลาเจน ซึ่งเป็นพันธะไฮโดรเจน (Stryer, 1975) มากกว่าคอลลาเจนที่สกัดที่ 10 องศาเซลเซียส การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการย่อยที่ 10 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาต่าง ๆ เกิดเร็วกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงมีการสลายพันธะเชื่อมระหว่างสายโปรตีนได้มากกว่า

ในการทดลองนี้ คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในการทดลองนี้ มีอุณหภูมิในการเสียสภาพ เท่ากับ 39.5 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดโดย Noitup (2004) ที่มีอุณหภูมิในการเสียสภาพเท่ากับ 36.6 องศาเซลเซียส เนื่องจากคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดโดย Noitup (2004) สกัดโดยใช้กรดได้คอลลาเจนที่สามารถละลายได้ในกรด แล้วจึงเติมเอนไซม์เปปซินเพื่อตัดทีโลเปปไทด์ ส่วนคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในการทดลองนี้ สกัดโดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ซึ่งคอลลาเจนที่สกัดได้จะทนต่อความร้อนได้ดีกว่าของ

Noitup (2004) นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากคอลลาเจนที่ได้หลังการทำแห้งแบบระเหิดมีลักษณะที่ต่างกัน คือ ในการทดลองนี้คอลลาเจนที่ได้หลังการทำแห้งจะมีลักษณะเป็นเส้นใยจับกันแน่นดึงออกจากกันได้ยาก ส่วนคอลลาเจนที่สกัดโดย Noitup (2004) จะมีลักษณะเป็นเส้นใยแต่ไม่ได้จับตัวกันแน่นสามารถดึงออกจากกันได้ง่าย เนื่องมาจากในขั้นตอนก่อนการไดอะไลซิสมีการใช้สัดส่วนของกรดในการละลายตะกอนคอลลาเจนที่น้อยกว่าวิธีของ Noitup (2004) ทำให้หลังจากไดอะไลซิสคอลลาเจนที่ได้มีการจับตัวกันแน่นเกิดลักษณะเป็นเจล

อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนแสดงดังตารางที่ 4 พบว่าคอลลาเจนจากหนังวัวมีอุณหภูมิในการเสียสภาพที่สูงที่สุด คือ 45.6 องศาเซลเซียส ซึ่งคอลลาเจนที่ได้จากสัตว์บกจะมีความคงตัวต่อความร้อนมากกว่าคอลลาเจนที่ได้จากสัตว์น้ำ เนื่องจากมีปริมาณของกรดอิมิโน (โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน) ที่สูงซึ่งจะทำให้โครงสร้างที่เป็นฮีลิกซ์มีความคงตัวมากขึ้น (Wong, 1989)

คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดที่อุณหภูมิ 20 และ 28 องศาเซลเซียส ไม่สามารถหาอุณหภูมิในการเสียสภาพได้เนื่องจากคอลลาเจนดังกล่าวประกอบด้วยเปปไทด์ขนาดเล็ก จำนวนมาก ดังปรากฏในผลของ SDS-PAGE (ดังภาพที่ 13) ดังนั้นจึงมีการดูดกลืนพลังงานความร้อนที่น้อยและมี peak เล็ก ๆ เกิดขึ้นจำนวนมาก ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์ว่าที่ตำแหน่งใดเป็นอุณหภูมิในการเสียสภาพ

สารละลายที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างมีผลต่ออุณหภูมิในการเสียสภาพ โดยเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างในสารละลากรดและสารละลายของน้ำปราศจากอิออน พบว่า สารละลายกรดจะทำให้อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนต่ำลง ซึ่งในการทดลองนี้เตรียมตัวอย่างในน้ำปราศจากอิออนในการศึกษาโดยวิธี differential scanning calorimetry คอลลาเจนจาก Noitup (2004) และคอลลาเจนจากหนังลูกวัว มีอุณหภูมิในการเสียสภาพ เท่ากับ 36.6 และ 45.6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4) ซึ่งสูงกว่าคอลลาเจนจากแหล่งเดียวกันซึ่งรายงานโดย Noitup (2004) ที่มีการเตรียมตัวอย่างโดยละลายในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 3.7) ซึ่งมีอุณหภูมิในการเสียสภาพ เท่ากับ 33.8 และ 40.8 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ความแตกต่างดังกล่าวนี้เป็นผลจากการที่กรดตัดพันธะไฮโดรเจนในโมเลกุลคอลลาเจน (Gustavson, 1956) ทำให้ความคงตัวของสายฮีลิกซ์ลดลง โครงสร้างของคอลลาเจนจึงถูกทำลายได้ง่ายขึ้น ทำให้ความคงตัวต่อความร้อนลดลง กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนแสดงดังภาคผนวก ค

ตารางที่ 7 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสดที่อุณหภูมิ 4 10 องศาเซลเซียส คอลลาเจนจากหนังลูกวัว และคอลลาเจนที่สกัดโดย Noitup (2004)

ตัวอย่าง	อุณหภูมิในการเสียสภาพ (องศาเซลเซียส)		
	To	Tp	Tr
4 องศาเซลเซียส	38.5	39.5	40.1
10 องศาเซลเซียส	35.9	37.5	39.6
calf	45.0	45.6	46.9
Noitup	35.5	36.6	38.2

หมายเหตุ To (onset temperature) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่มีการดูดกลืนความร้อนในการเสียสภาพ
Tp (peak maximum temperature) คือ อุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด
Tr (recovery temperature) คือ อุณหภูมิสุดท้ายในการดูดกลืนความร้อน
calf คือ calf skin acid soluble collagen type I
Noitup คือ acid soluble pepsin digestion

4. ศึกษาการจับตัวกันของโมเลกุลของคอลลาเจน (Collagen self-assembly)

4.1 อัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจน (Rate of collagen self-assembly)

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจนในสภาวะที่อยู่ภายนอกเซลล์ (*in vitro*) ได้แก่ ความเข้มข้นของคอลลาเจนในสารละลาย pH ของสารละลาย และอุณหภูมิในการปล่อยให้เกิดการจับตัวกัน ซึ่งการทดลองนี้ได้เลือกใช้วิธีการของ Noitup (2004) ที่ให้อัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจนสูงที่สุดคือ ใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร pH 6 และอุณหภูมิในการปล่อยให้จับตัวกัน 25 องศาเซลเซียส ลักษณะของเส้นความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร ของสารละลายคอลลาเจนที่เวลาต่าง ๆ ของการเกิดการจับตัวกันของคอลลาเจน มีลักษณะเป็น sigmoid curve กล่าวคือ ในช่วงแรกหรือ lag phase มีการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงต่ำ จากนั้นจะเข้าสู่ growth phase ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเปลี่ยนเป็นคงที่ เมื่อเข้าสู่ maturity phase

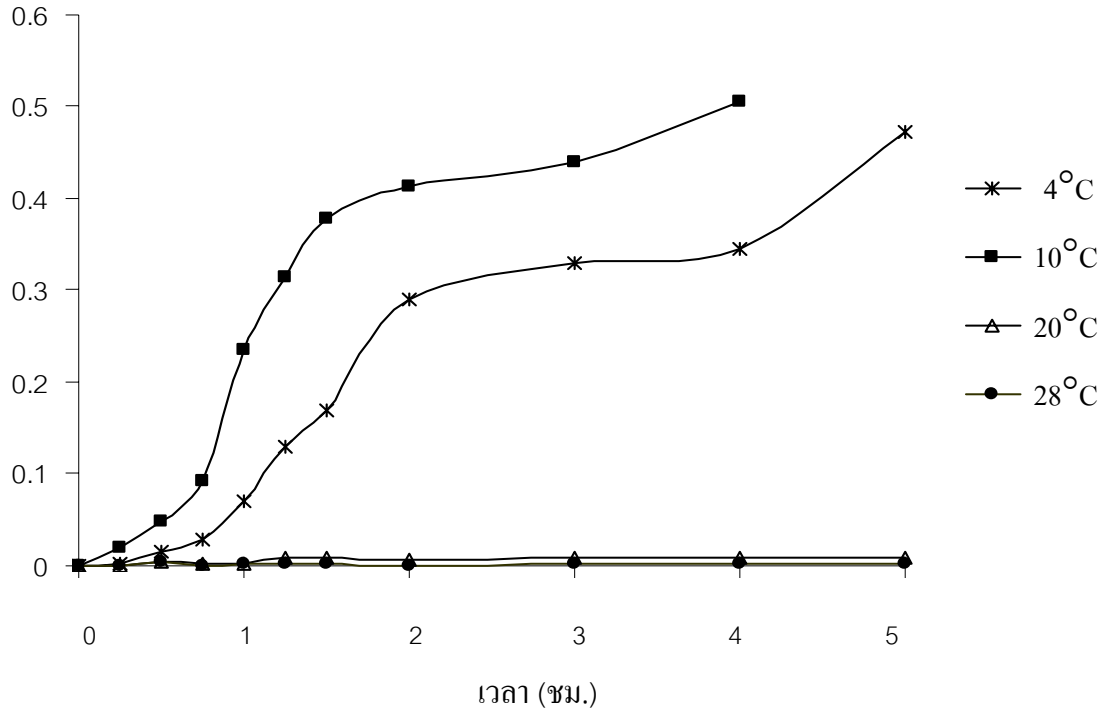
(Engel, 1994; Veis and George, 1994) โดยคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส ให้ลักษณะแบบเดียวกัน แต่คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 20 และ 28 องศาเซลเซียส ไม่พบลักษณะดังกล่าว คือมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำมาก (ใกล้ศูนย์) ดังแสดงในภาพที่ 14

จากการศึกษาอุณหภูมิในการสกัดที่ 4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส พบว่าคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จะมีอัตราเร็วในการจับตัวกันสูงที่สุด ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับ Lin and Liu (2004b) ที่ศึกษาการจับตัวกันของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังตีนไก่โดยใช้กรดอะซิติกและเอนไซม์เปปซิน ที่อุณหภูมิ 4 12 18 และ 24 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้จับตัวกันใน physiological buffer (0.13 M phosphate, 0.022 NaCl, pH 7) พบว่าคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส จะมีอัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจนสูงที่สุด

คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 และ10 องศาเซลเซียส มีอัตราเร็วในการจับตัวกันสูง ซึ่ง Bannister and Burns (1972) กล่าวว่าคอลลาเจนจะจับตัวกันได้ดีถ้ายังคงมีโครงสร้างสามมิติที่สมบูรณ์ จากการศึกษาลักษณะหน่วยย่อยของคอลลาเจนโดยการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนจากการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ (4 และ 10 องศาเซลเซียส) ประกอบด้วยสาย α และβ เป็นส่วนใหญ่ ส่วนคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิสูง (20 และ 28 องศาเซลเซียส) จะเกิดการย่อยสลายสายα และβ ได้เปปไทด์ขนาดเล็กที่มีโมเลกุลน้อยกว่า 50 kDa จำนวนมาก ทำให้การจับตัวกันเกิดช้า

จากการทดลองนี้พบว่าคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่ปล่อยให้จับตัวกันเป็นเวลา 4 ชั่วโมง สารละลายจะเกิดการจับตัวกันแล้วแยกชั้นมีลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ เช่นเดียวกับคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อปล่อยให้จับตัวกันเป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร



ภาพที่ 14 อัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส

4.2 โครงสร้างของคอลลาเจนเมตริกซ์ โดยใช้กล้อง confocal laser scanning microscope (CLSM)

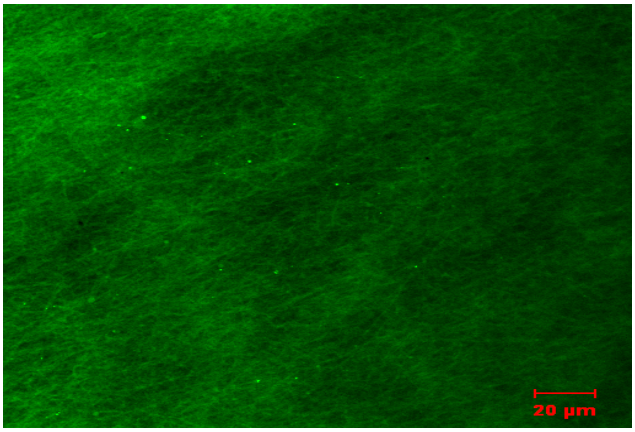
ภาพที่ 15 แสดงภาพของโครงสร้างคอลลาเจนเมตริกซ์ ที่กำลังขยาย 40 เท่าของเลนส์วัตถุ จะเห็นภาพโครงสร้างของคอลลาเจนเมตริกซ์ในบริเวณกว้างและเมื่อเพิ่มกำลังขยายเลนส์วัตถุเป็น 100 เท่า เพื่อศึกษาโครงสร้างที่ละเอียดของตำแหน่งต่าง ๆ ในเมตริกซ์ (แสดงดังภาพที่ 16) พบว่า เมตริกซ์ที่ได้จากคอลลาเจนที่สกัดที่ 4 องศาเซลเซียส ปล่อยให้จับตัวกันเป็นเวลา 4 และ 5 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 4 ชั่วโมงนั้นให้คอลลาเจนเมตริกซ์ที่เป็นโครงข่าย (network) สานกันละเอียดกว่าที่ 5 ชั่วโมง โดยเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยคอลลาเจน มีขนาดเฉลี่ย 0.41 และ 0.48 ไมโครเมตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับคอลลาเจนเมตริกซ์ที่ได้จากคอลลาเจนที่สกัดที่ 10 องศาเซลเซียสที่เวลาในการจับตัวกันนาน 4 ชั่วโมง พบว่า เส้นใยคอลลาเจนที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น (0.50 ไมโครเมตร) ในขณะที่โครงข่ายคอลลาเจนมีความละเอียดใกล้เคียงกับเมตริกซ์ที่ได้จากคอลลาเจนที่สกัดที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ปล่อยให้จับตัวกันเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสดโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5M และเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 0.1% (w/v) ที่ 10 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการจับตัวกันสั้นกว่าคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดที่ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการเกิดนิวเคลียสที่เร็วกว่าทำให้ได้เส้นใยคอลลาเจนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ และเกิดการจับตัวกันเป็นเมตริกซ์ได้ดี ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อที่ 4.1

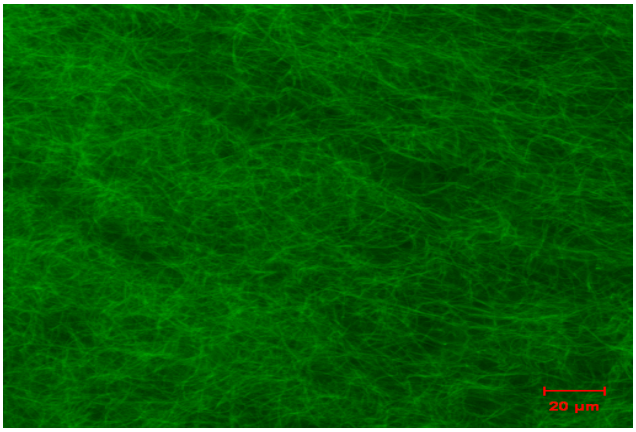
ตารางที่ 8 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ และปล่อยให้จับตัวที่เวลาต่างๆ

อุณหภูมิที่สกัดคอลลาเจน (องศาเซลเซียส)	เวลาที่จับตัวกัน (ชั่วโมง)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ไมโครเมตร)
4	4	0.41 ± 0.07
4	5	0.48 ± 0.08
10	4	0.50 ± 0.07

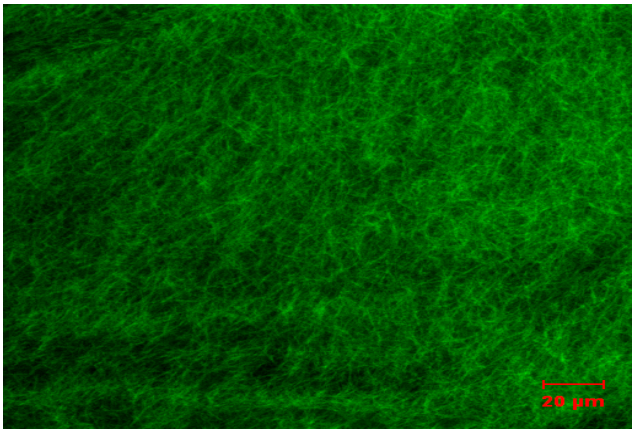
หมายเหตุ ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคำนวณจากเส้นใย 100 เส้น



(1)



(2)



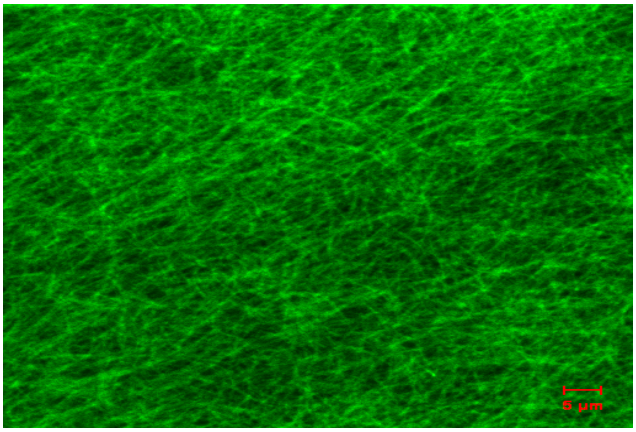
(3)

ภาพที่ 15 โครงสร้างคอลลาเจนเมตริกซ์ที่กำลังขยาย 40 เท่าของเลนส์วัตถุ

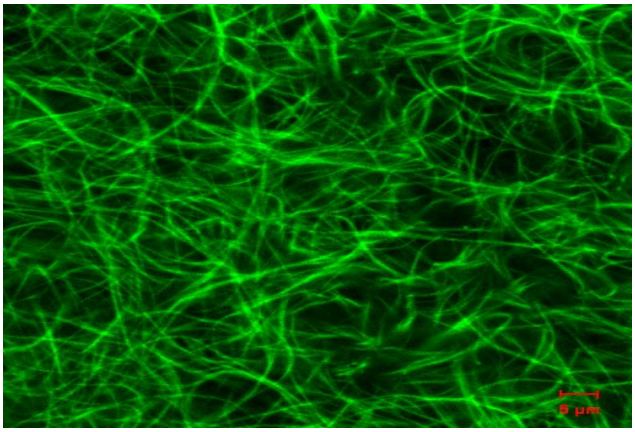
(1 : คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปล่อยให้จับตัวเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2: คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปล่อยให้จับตัวเป็นเวลา 5 ชั่วโมง

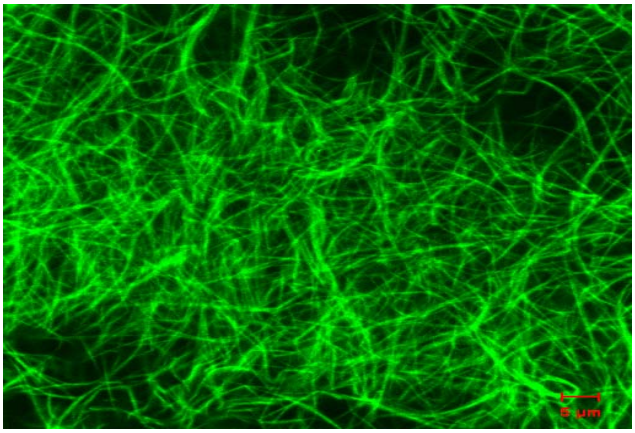
3: คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ปล่อยให้จับตัวเป็นเวลา 4 ชั่วโมง)



(1)



(2)



(3)

ภาพที่ 16 โครงสร้างคอลลาเจนเมตริกซ์ที่กำลังขยาย 100 เท่าของเลนส์วัตถุ

(1 : คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปล่อยให้จับตัวเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2: คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปล่อยให้จับตัวเป็นเวลา 5 ชั่วโมง

3: คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ปล่อยให้จับตัวเป็นเวลา 4 ชั่วโมง)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดสดโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5M (pH 2.5) ร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 0.1% (w/v) เพียงครั้งเดียว ให้ผลได้สูงที่สุด คือ 439.32 มิลลิกรัมต่อกรัมหนังปลาสดที่หักลบความชื้นแล้ว การใช้สัดส่วนหนังปลาสดต่อกรด 1:10 ถึง 1:25 พบว่าถ้าสัดส่วนกรดเพิ่มขึ้นปริมาณผลได้จะลดลง ดังนั้นสัดส่วนหนังต่อกรดที่ให้ผลได้มากที่สุด คือ 1:10

2. อุณหภูมิในการสกัดมีผลต่อการสกัดคอลลาเจน คือ ที่อุณหภูมิสูง (20 และ 28 องศาเซลเซียส) อัตราการย่อยโดยกรดและเอนไซม์เร็ว ทำให้ได้เปปไทด์สายสั้น ๆ ที่ไม่สามารถตกตะกอนได้ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 M จึงทำให้ผลได้ต่ำ การสกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสให้ปริมาณผลได้มากที่สุด เมื่อควบคุมระยะเวลาในการสกัดเท่ากับ 6 ชั่วโมง

3. คอลลาเจนจากสัตว์บกมีอุณหภูมิในการเสียสภาพที่สูงกว่าคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิในการเสียสภาพที่สูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ส่วนคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 20 และ 28 องศาเซลเซียสไม่สามารถวัดอุณหภูมิในการเสียสภาพได้ เนื่องจากประกอบด้วยเปปไทด์ขนาดโมเลกุลเล็กจำนวนมาก

4. คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีอัตราเร็วในการจับตัวกันที่เร็วที่สุด และเมื่อศึกษาโครงสร้างของคอลลาเจนเมตริกซ์ พบว่า ขนาดของเส้นใยของคอลลาเจนที่สกัดที่ 10 องศาเซลเซียส มีขนาดใหญ่กว่าที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจับตัวในเวลา 4 ชั่วโมง เส้นใยคอลลาเจนจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเวลาในการปล่อยให้มีการจับตัวเพิ่มขึ้น จาก 4 เป็น 5 ชั่วโมง ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. คอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิสูงประกอบด้วยเปปไทด์โมเลกุลเล็ก ดังนั้นถ้าต้องการผลิตคอลลาเจนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่านี้ควรทำการสกัดที่อุณหภูมิสูงขึ้น เพื่อให้ได้คอลลาเจนที่สามารถละลายน้ำได้ดี และต้องมีการคัดเลือกโมเลกุลให้มีขนาดเล็กสม่ำเสมอกัน

2. การเตรียมคอลลาเจนเมตริกซ์วางบนสไลด์แก้วชิ้นตัวอย่างควรมีขนาดบาง ซึ่งจะทำให้เห็นภาพชัดเจนขึ้น

3. ในการเตรียมตัวอย่างคอลลาเจนสำหรับทำ SDS-PAGE ควรจะระมัดระวังไม่ให้ตัวอย่างดูดความชื้นจากบรรยากาศโดยรอบเพราะจะทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างลดลง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

วิมล เหมะจันทร. 2540. **ชีววิทยาปลา.** พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อัมพร ภิญโญวิทย์. 2545. **มีนวิทยา.** โรงพิมพ์ต้นฉบับ จำกัด, จันทบุรี.

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

Bannister, D.W. and A.B. Burns. 1972. Pepsin treatment of avian skin collagen. **Biochemical Journal.** 129: 677-681.

Bergmeyer, H.U. 1984. **Methods in Enzymatic Analysis.** 3 rd ed. Academic Press, New York.

Carr, C.W. 1953. Studies on the binding of small ions in protein solution with the use of membrane electrodes:III. The binding of chloride ions in solution of various proteins. **Arch. Biochem. Biophys.** 46: 417-423.

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

Devictor, P., R. Allard, E. Perrier and A. Hue. 1995. **Unpigmented fish skin, particularly from flat fish, as a novel industrial source of collagen, extraction method, collagen and biomaterial thereby obtained.** U.S. Patent 5,420,248.

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

Engel, J. 1994. Concepts of self-assembly in biological system, pp. 3.2.1-3.2.3. *In* J.E. Coligan, B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher and P.T. Wingfield, eds. **Current Protocols in Protein.** A John & Sons, Inc., New York.

Friess, W. 1998. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European J. Pharma. and Biopharma.** 45: 113-136.

Gustavson, K. 1956. **The Chemistry and Reactivity of Collagen.** Academic Press, New York.

Hulmes, D.J.S. 1992. The collagen superfamily-diverse structure and assemblies. **Essays** 27: 49-67.

Ikada, Y. 2002. Biological materials, pp. 1-7. *In* R. Barbucci, ed. **Integrated Biomaterials Science.** Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Johns, P. 1977. The structure and composition of collagen containing tissues, pp. 32-72. *In* A.G. Ward and A. Courts, eds. **The Science and Technology of Gelatin.** Academic Press, Inc., London.

Jose, J. and W.F. Harrington. 1964. Role of pyrrolidine in structure and stabilization of collagen. **J. Molecular Biol.** 9: 267-287.

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. 1992. Wide distribution of the skin type I collagen α3 chain in bony fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B.** 99: 473-476.

Kittipattanabawon, P., S. Benjakul, W Visessanguan, T. Nagai and M. Tanaka. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chem.** 89: 363-372.

Komsa-Penkova, R., R. Koyonava, G. Kostov and B. Tenchov. 1999. Discrete reduction of type I collagen thermal stability upon oxidation. **Biophys Chem.** 83: 185-195.

Kucharz, E.J. 1992. **The Collagens : Biochemistry and Pathophysiology**. Springer-Verlage, Berlin.

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. **Inter. J. Pharma.** 221: 1-22.

Lin, Y.K. and D.C. Liu. 2006a. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. **Food Chem.** 99: 244-251.

_____ and D.C. Liu. 2006b. Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. **Food Chem.** 94: 621-625.

Mizuta, S., J.H. Hwang and R. Yoshinaka. 2003. Molecular species of collagen in pectoral fin cartilage of skate (*Raja kenojei*). **Food Chem.** 80: 1-7.

Nagai, T. and N. Suzuki. 2002. Preparation and partial charactrization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. **Food Chem.** 76: 149-153.

Nagai, T., Y. Araki and N. Suzuki. 2002. Collagen of skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). **Food Chem.** 78: 173-177.

Noitup, P. 2004. **Collagen Extraction from Fish Skin By-product in The Frozen Fish Industry: Study of Some Characteristics of Extracted Collagen.** Dissertation, Kasetsart University.

Ogawa, M., R.J. Portier, M.W. Moody, J. Bell, M.A. Schexnayder and J.N. Losso. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagen isolation from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). **Food Chem.** 88: 495-501.

Piez, K.A. 1985. **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering.** Wiley, New York.

Rochdi, A., L. Foucat and J. Renou. 2000. NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen. **Food Chem.** 69: 295-299.

Sadowska, M., I. Kolodziejska and C. Niecikowska. 2003. Isolation of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chem.** 81: 257-262.

Senaratne, L.S., P.J. Park and S.K. Kim. 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresource Tech.** 97: 191-197.

Smith, M.M. and R.J. Mckey. 1986. Haemulidae, pp. 564-571. *In* M.M. Smith and P.C. Heemstra, eds. **Smith's Sea Fishes.** Springer-Verlag, Berlin.

Stryer, L. 1975. **Biochemistry.** W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Swan, J.E. and P.J. Torley. 1991. **Collagen Structure, Function and Uses.** Meat Research Institute of New Zealand Inc., Hamilton.

Takai, M., Y. Shimizu, J. Shimizu, K. Yamazaki, Y. Kumabayashi, H. Shimizu and K. Yamada. 1997. **Wound healing composition using squid chitin and fish collagen.** U.S. Patent Patent 5,698,228.

Veis, A. and A. George. 1994. Fundamentals of interstitial collagen self-assembly, pp. 15-45. *In* P.D. Yurchenco, D.E. Birk and R.P. Mecham, eds. **Extracellular Matrix Assembly and Structure.** Academic Press Inc., San Diego.

Ward, A.G. and A. Courts. 1977. **The Science and Technology of Gelatin.** Academic Press, London.

Whitaker, J.R. 1994. **Principle of Enzymology for the Food Sciences.** 2 rd ed. Marcel Dekker Inc, New York.

Whitaker, J.R. and S.R. Tannenbaum. 1977. **Food Protein.** AVI Pub., Connecticut.

Wong, D.W.S. 1989. **Mechanism and Theory in Food Chemistry.** Van Nostrand Reinhold, New York.

Wong, J.W., J.F. Frank and S. Bailey. 1997. Visualization of eggshell membranes and their interaction with *Salmonella enteritidis* using confocal laser scanning microscopy. **J. Food Protection.** 60 (9): 1022-1028.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ก1 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณผลได้ (Yield) หลังการทำแห้งแบบระเหิดที่สัดส่วนต่าง ๆ

Source of Variation	df	Sum of Squares	Mean Square	F-value
Yield	3	2154.828	718.276	183.671*
Error (within treatment)	4	15.643	3.911	
Total	7	2170.471		

* ค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์อย่างน้อย 1 คู่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ ก2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณผลได้ (Yield) หลังการทำแห้งแบบระเหิดที่สัดส่วนต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

RATIO	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1:25	2	3.162		
1:20	2		13.603	
1:15	2		17.494	
1:10	2			47.338
Sig.		1.000	.121	1.000

ตารางผนวกที่ ก3 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณผลได้ (Yield) หลังการทำแห้งแบบระเหิดที่อุณหภูมิต่างๆ

Source of Variation	df	Sum of Squares	Mean Square	F-value
Yield	3	178353.794	59451.265	67.413*
Error (within treatment)	4	3521.599	881.900	
Total	7	181881.393		

* ค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์อย่างน้อย 1 คู่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ ก4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณผลได้ (Yield) หลังการทำแห้งแบบระเหิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Temperature	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
28	2	47.338			
20	2		171.305		
4	2			328.204	
10	2				439.3251
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ภาคผนวก ข

วิธีการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE

ภาคผนวก ข

วิธีการทำอิเลกโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE

ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

การเตรียม Seperating gel

1. ประกอบ mini-gel apparatus (Bio-Rad, Mini Protein II) ตามวิธีประกอบ แผ่นแก้วต้องสะอาดและแห้ง สวมถุงมือในการประกอบเครื่อง

2. ผสมสารละลายของเจล ตามตารางภาคผนวกที่ ข.1 โดยผสมสารละลายต่าง ๆ ตามตารางใน sidearm flask ยกเว้น APS และ TEMED ซึ่งจะใส่หลังการ degas แล้ว 15 นาที โดยค่อย ๆ ผสม APS และ TEMED ลงในสารละลายที่ผ่านการ degas เพื่อช่วยให้เกิด polymerization

3. ใช้ ปิเปตดูดเจลใส่ลงช่องระหว่างแผ่นแก้ว (ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ) จนระดับประมาณ 1.5 ถึง 2 ซม.จากขอบบนของแผ่นแก้วที่มีระดับต่ำกว่า ทำโดยรวดเร็วก่อนที่เจลจะแข็งตัว

4. ใช้น้ำปิดทับเจล (หนาประมาณ 3 มม.) ตั้งทิ้งไว้ 45-60 นาที ให้เจลเกิดการ polymerize ซึ่งจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและสารละลายที่คลุมผิวเจลอยู่อย่างชัดเจน

5. เมื่อเจล polymerize ล้างส่วนบนของเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งและซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง

การเตรียม Stacking Gel

1. เตรียม 10 มิลลิลิตรของ Stacking gel ตามตารางภาคผนวกที่ ข.1 โดยผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันใน sidearm flask ที่ผ่านการ degas แล้ว 15 นาที จึงค่อยๆเติม APS และ TEMED ลงไป

2. ซับตอนบน Separating gel ให้แห้งด้วยกระดาษกรองอย่าให้มีฟองอากาศค้างอยู่บน gel

3. ดูด Stacking gel ด้วย Pasteur pipette ที่สะอาด ค่อย ๆ ใส่ลงตรงกลางลงมาตามด้านข้างของ spacer จนได้ความสูงของเจลในแผ่นแก้วประมาณ 3 ซม.

4. ค่อย ๆ สอด Teflon Comb ลงในชั้น Stacking gel ทีละช่องเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศ โดยเติม Stacking gel ให้เต็ม

5. ปล่อยให้เจล polymerize 30-40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ตารางภาคผนวกที่ ข1 สูตรสำหรับการเตรียม SDS-PAGE Separating ang Stacking Gel

ส่วนประกอบ	Separating gel (0.375M Tris pH 8.8)		Stacking gel (0.125M Tris, pH 6.8)
	12% gel	7.5% gel	4% gel
1. Distilled water	3.35 ml	4.85 ml	6.1 ml
2. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	-
3. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	-	2.5 ml
4. 10%(w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl
5. Acrylamide/bis (Degas for $\geq$ 15 min at room temperature)	4 ml	2.5 ml	1.33 ml
6. 10% ammonium persulfate (fresh daily)	50 µl	50 µl	50 µl
7. TEMED	5 µl	5 µl	10 µl
TOTAL MONOMER	10 ml	10 ml	10 ml

การใส่ตัวอย่างลงในเจล

การใส่ตัวอย่างมี 2 วิธี คือ ใส่ในหลุมเจลที่เตรียมโดยใช้ well-forming comb หรือ load ตัวอย่างเดียวบน 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 องศาเซลเซียส (ตามคู่มือของ BIORAD ให้เจือจางตัวอย่างอย่างน้อย 1: 4 เท่าด้วย sample buffer และต้มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที) ถ้าตัวอย่างแห้งละลายด้วย sample buffer จำนวน 50-100 µl 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 ซึ่งอยู่ด้านใน แล้วเติมเพิ่มจนระดับครึ่งหนึ่งระหว่าง short และ long plate อย่าให้ล้น chamber อันบน

1.3 เติม buffer ที่เหลือใส่ chamber ล่างจนท่วม gel ตอนล่าง 1 ซม. ถ้ามีฟองอากาศใช้ปิเปตต์กวนไล่ฟองอากาศ

1.4 ใส่ตัวอย่าง 5 µl ลงใน well ข้างใต้ electrode buffer ด้วย Hamilton syringe หรือปิเปตต์ การใส่ตัวอย่างให้ปล่อยตัวอย่างลงที่ระยะ 1-2 มม. จาก well bottom โดยให้ปลาย syring หรือปลายปิเปตต์จรดที่บริเวณมุมของหลุม

2. Loading a Single Sample per gel

เป็นการแยกตัวอย่างบน flat gel surface ในการวิเคราะห์ เตรียม stacking gel ให้ถึงระดับ 1 มม. จาก short plate โดยไม่ใช้ comb ปิดทับด้วย overlay solution เมื่อเจลแข็งแล้วรินออกและประกอบส่วน core บรรจุ electrode buffer ลงใน chamber บนและล่าง แล้วค่อย ๆ ใส่ตัวอย่างให้สม่ำเสมอเริ่มจาก gel ด้านหนึ่งจนตลอดตามยาวโดยใส่ลงให้ใกล้ผิวเจลมากที่สุด (1-2 มม.)

Running the gel

เมื่อใส่ตัวอย่างโปรตีน ตัวอย่างจะอยู่ระหว่าง electrode และเมื่อ apply potential ก็จะครบวงจร โปรตีนจะเคลื่อนที่ไปเป็นแถบ (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 30 mA ต่อเจลซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของอิออนใน buffer ทำให้เกิดความต้านทานเพิ่มขึ้น

การนำเอาเจลออกจากเครื่อง

1. ปิด power supply และเอาสายที่ต่อออก
2. เปิดฝาเซลล์นำ cooling core ชั้นในขึ้นมาจาก chamber ล่าง เท buffer ใน chamber อัน บนทิ้งไป
3. ดัน clamp ออกจาก cooling core
4. คลายสกรู sandwich clamp assemblies ออก
5. นำแผ่น sandwich ออกและใช้ forcep ขวดน้ำกลั่นค่อย ๆ ดันแผ่นแก้วออกในระหว่าง ที่ดันแผ่นแก้วออกให้ใช้น้ำกลั่น rinse ตามตลอด

การย้อมสีเจล

การย้อมสีโดย

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

การล้างสีย้อม

นำเจลมาแช่ในสารละลาย 40% Methanol, 10% Acetic acid เปลี่ยนสารละลายที่ใช้หลายๆ ครั้ง จะเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน (การ Stain และ Destain ทำที่อุณหภูมิห้อง และควรเขย่าเบา ๆ)

วิธีการเตรียมสารเคมี

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

ชั่ง acrylamide 29.2 กรัม และ methylenebisacrylamide 0.8 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากอิออนเป็น 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

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

% C คือ น้ำหนักเป็นกรัมของ methylenebisacrylamide ต่อน้ำหนักเป็นกรัมของ acrylamide กับน้ำหนักเป็นกรัมของ methylenebisacrylamide

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

2. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ชั่ง Tris base 27.23 กรัม ใส่น้ำปราศจากอิออนประมาณ 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 ใส่น้ำปราศจากอิออนประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วยสารละลาย HCl ความเข้มข้น 6 N แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 10% SDS

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

5. Sample buffer

มีส่วนประกอบดังนี้ (หน่วยเป็น มิลลิลิตร)

น้ำปราศจากอิออน	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 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากอิออน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาให้ใช้ทำการเจือจางสารละลาย 5X electrode (Running) buffer ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากอิออน 240 มิลลิลิตร

7. Staining solution

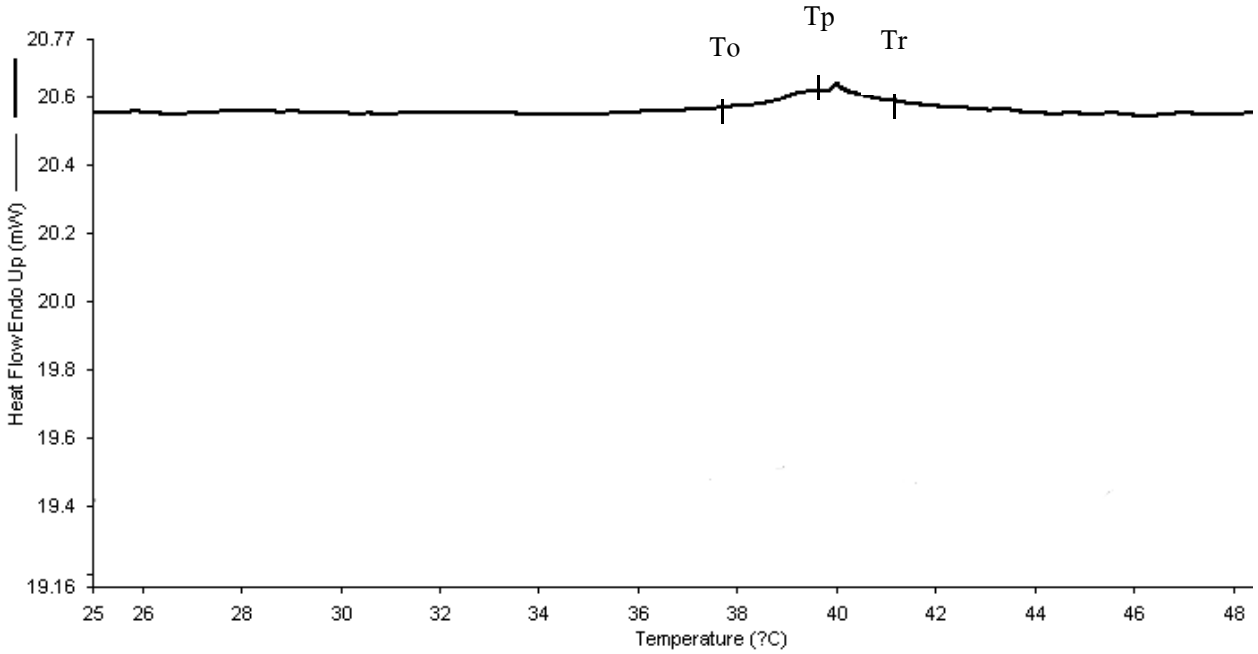
เติม Coomassie brilliant blue R-250 1 กรัม ใน fixing solution (มีส่วนผสมของ methanol 40% และ กรดอะซิติก 10%) ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร คนจนละลายหมด กรองเก็บในขวดแก้วที่อากาศเข้าไม่ได้

8. Destaining solution

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

ภาคผนวก ค

กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจน

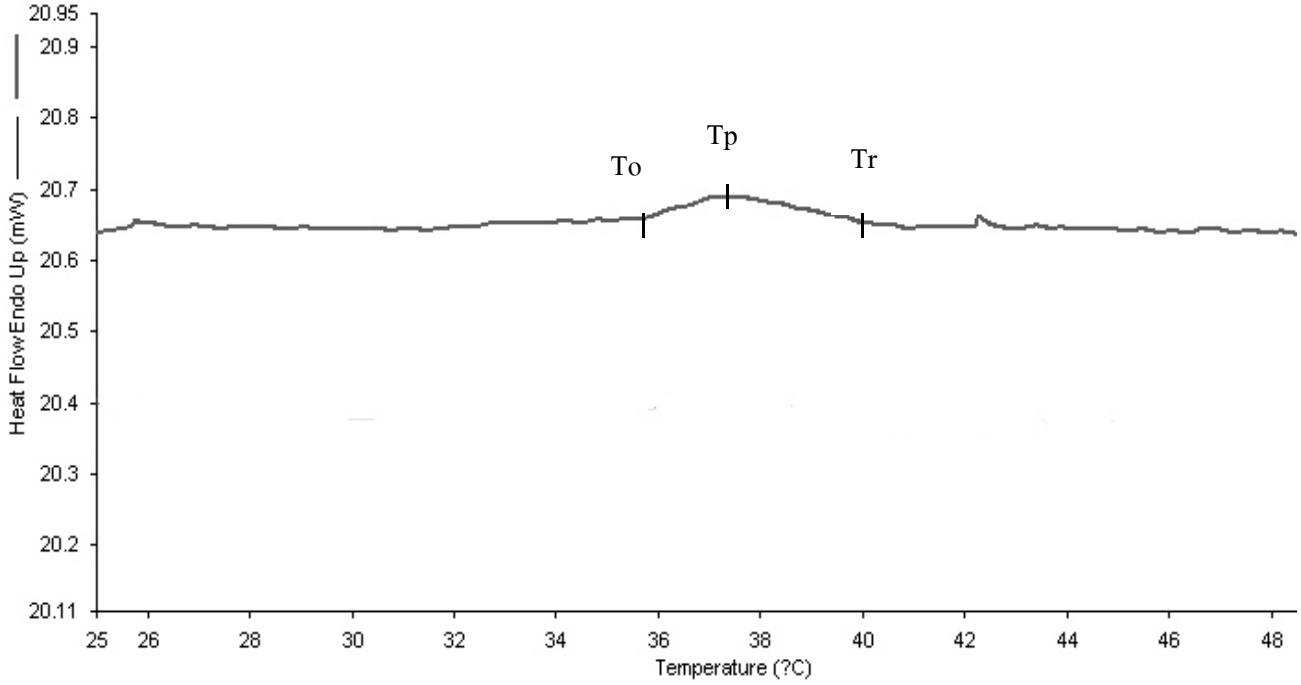


ภาพผนวกที่ ค1 กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ To (onset temperature) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่มีการดูดกลืนความร้อนในการเสียสภาพ

Tp (peak maximum temperature) คือ อุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด

Tr (recovery temperature) คือ อุณหภูมิสุดท้ายในการดูดกลืนความร้อน

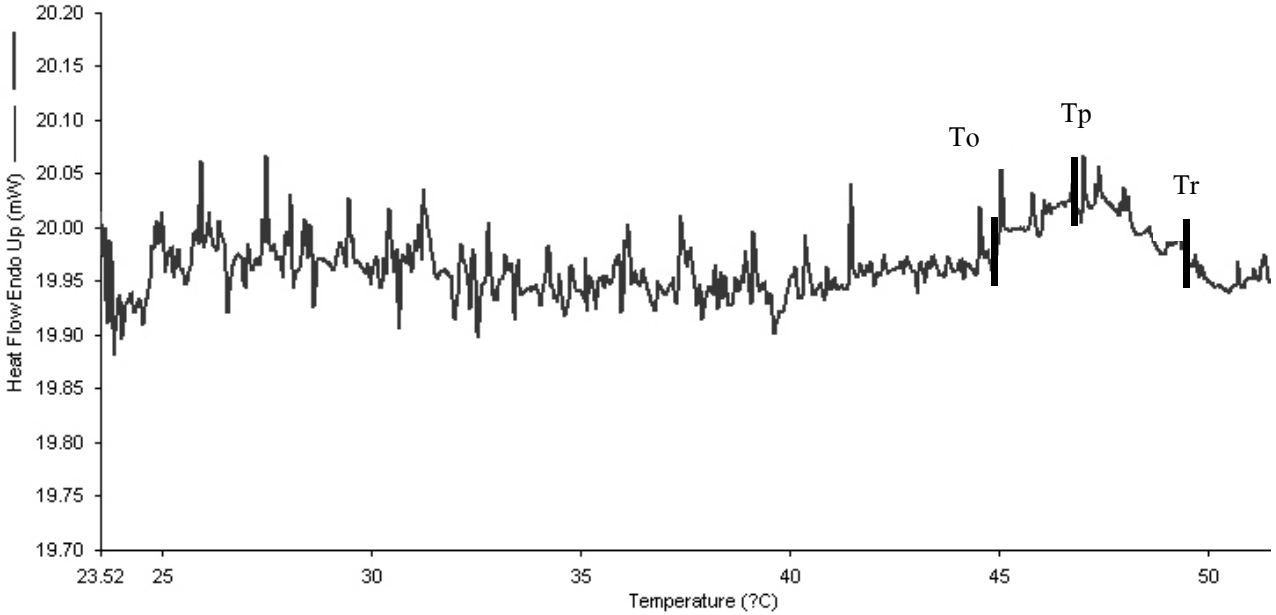


ภาพผนวกที่ ค2 กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ To (onset temperature) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่มีการดูดกลืนความร้อนในการเสียสภาพ

Tp (peak maximum temperature) คือ อุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด

Tr (recovery temperature) คือ อุณหภูมิสุดท้ายในการดูดกลืนความร้อน

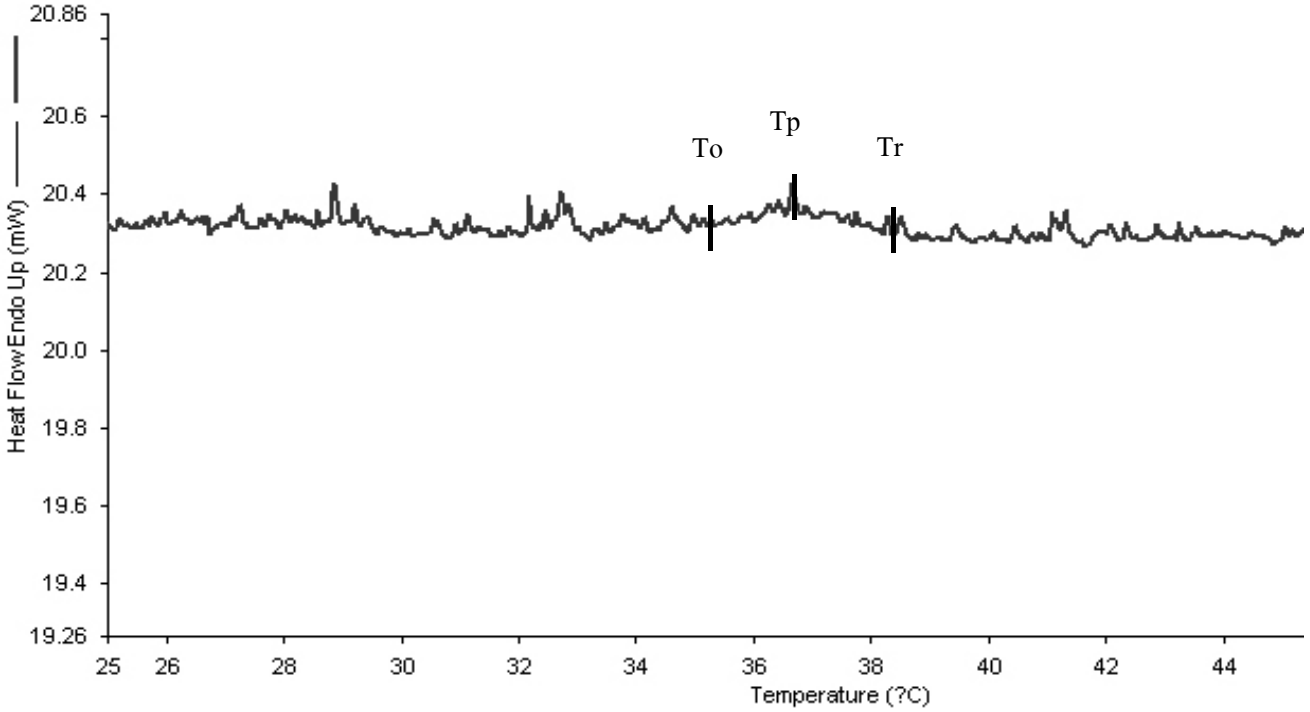


ภาพผนวกที่ ค3 กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนจากหนังวัว

หมายเหตุ To (onset temperature) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่มีการดูดกลืนความร้อนในการเสียสภาพ

Tp (peak maximum temperature) คือ อุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด

Tr (recovery temperature) คือ อุณหภูมิสุดท้ายในการดูดกลืนความร้อน



ภาพผนวกที่ ค 4 กราฟแสดงอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดโดย Noitup (2004)

หมายเหตุ To (onset temperature) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่มีการดูดกลืนความร้อนในการเสียสภาพ

Tp (peak maximum temperature) คือ อุณหภูมิที่มีการดูดกลืนความร้อนมากที่สุด

Tr (recovery temperature) คือ อุณหภูมิสุดท้ายในการดูดกลืนความร้อน

ภาคผนวก ง

ค่าการดูดกลืนแสงในการศึกษาอัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจน

ตารางผนวกที่ ง1 ค่าการดูดกลืนแสงในการศึกษาอัตราเร็วในการจับตัวกันของคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)	เวลาในการปล่อยให้จับตัวกัน (นาที)										
	0	15	30	45	60	75	90	120	180	240	300
4	0.000	0.002	0.015	0.028	0.070	0.130	0.168	0.290	0.328	0.346	0.471
10	0.000	0.020	0.049	0.092	0.234	0.313	0.377	0.414	0.440	0.504	-
20	0.000	0.000	0.003	0.001	0.003	0.008	0.009	0.007	0.009	0.008	0.008
28	0.000	0.001	0.003	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวนันทพร อัคนิจ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	15 สิงหาคม 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดอุดรธานี
ประวัติการศึกษา	ระดับปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	รองชนะเลิศอันดับ 1 การแข่งขันตอบปัญหาวิชาการ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร “FoSTAT - Nesle′ Quiz Bowl 2003”
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2548