ผลของการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย *(Chitala ornate)*

IMPACT OF ULTRASOUND-ASSISTED PROCESS ON COLLAGEN EXTRACTION FROM CLOWN FEATHERBACK *(Chitala ornate)* SKIN

ปิณฑิรา อนันตลาภ
พีรยา ศรีสวัสดิ์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย *(Chitala ornate)*

IMPACT OF ULTRASOUND-ASSISTED PROCESS ON COLLAGEN EXTRACTION FROM CLOWN FEATHERBACK *(Chitala ornate)* SKIN

จัดทำโดย

ปิณฑิรา อนันตลาภ รหัสนักศึกษา 58080044

พีรยา ศรีสวัสดิ์ รหัสนักศึกษา 58080050

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.... 29 / พ.ค. / 2562

(ดร.สุพัตรา กาญจนประทุม)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย *(Chitala ornate)*
ชื่อนักศึกษา	ปิณฑิรา อนันตลาภ รหัสนักศึกษา 58080044
	พีรยา ศรีสวัสดิ์ รหัสนักศึกษา 58080050
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สุพัตรา กาญจนประทุม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย (*Chitala ornate*) โดยทำการศึกษาสภาวะของอัลตราซาวด์ที่ความกว้างของคลื่น (Amplitude) 20, 40, 60 และ 80% และที่ระยะเวลา (Duration) 10, 20 และ 30 นาที ที่มีผลต่อผลผลิตคอลลาเจนคิดเป็นของแข็งทั้งหมด (Total Solid Yield) ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน ความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน (Thermal stability) และ รูปแบบโปรตีน (Protein Pattern) เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด (ASC) พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดสามารถเพิ่มผลผลิตคอลลาได้ (31.28-56.79%) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ Amplitude 60-80% ($P<0.05$) ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของ Duration สามารถเพิ่มผลผลิตคอลลาเจนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ Amplitude ที่ 80% ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดมีผลต่อการลดลงของปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในคอลลาเจนที่ได้ในทุกๆ Amplitude ที่ทำการทดลอง ตามการเพิ่มขึ้นของ Duration ยกเว้นที่ Amplitude 20% จากผลความคงตัวต่อความร้อนโดย DSC พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดคอลลาเจนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นระเบียบในการจัดเรียงโครงสร้างของคอลลาเจน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ Triple helix ภายในคอลลาเจน ทำให้ค่าอุณหภูมิสูงสุดก่อนการเสียสภาพธรรมชาติ (T_{max}) และการเปลี่ยนแปลงของเอนทัลปี (ΔH) ของคอลลาเจนที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ที่สภาวะต่างๆ แตกต่างกัน รูปแบบโปรตีนจาก SDS-PAGE ของคอลลาเจนที่ได้แสดงสาย α1, α2, β และ γ เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับ ASC ในขณะเดียวกันพบการเสียสภาพของโปรตีนเปปไทด์ โดยการแตกหักได้เป็นเปปไทด์สายสั้น เนื่องจากการใช้อัลตราซาวด์ที่ระยะเวลานานขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อ Amplitude ที่ใช้สูงขึ้นด้วย ดังนั้นการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากรายสามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้สภาวะอัลตราซาวด์ที่ใช้มีผลต่อคุณภาพของคอลลาเจนที่สกัดได้ การศึกษาสภาวะอัลตราซาวด์ที่เหมาะสมกับแหล่งวัตถุดิบต่างๆจึงมีความจำเป็น เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงและมีคุณภาพ

คำสำคัญ: ปลากราย หนังปลา คอลลาเจน อัลตราซาวด์ การสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Impact of ultrasound-assisted process on collagen extraction from clown featherback *(Chitala ornate)* skin
Student name Student	Pinthira Anantalap ID 58080044
	Peeraya Srisawat ID 58080050
Program	Bachelor of Science in Food Science and Technology
Year	2019
Advisovor	Dr.Supatra Karnjanapratum

ABSTRACT

The present study aimed to study the impact of ultrasound-assisted process on characteristics of collagens extracted from clown featherback *(Chitala ornate)* skin using 0.5 M acetic acid for 48 hr. Different ultrasound conditions were conducted at various amplitude (20, 40, 60 and 80%) and duration times (10, 20 and 30 minutes). The resulting collagens were subjected to analyze the total solid yield, hydroxyproline content, protein pattern (SDS-PAGE) and thermal stability in comparison with the control sample (without ultrasound-assisted process, ASC). The ultrasound-assisted process increase) the collagen yield (31.28-56.79%), especially at 60-80% amplitude as the increasing of duration, especially those from 80% amplitude. However, the hydroxyproline content was decreased with the increasing of ultrasound treatment time for all amplitude used, excepted those from 20%. Based on thermal stability by DSC, the ultrasound-assisted process affected the change of ordered structure, which indicated the amount of triple helix within the collagen. Consequently, the enthalpy (ΔH) and T_{max} of collagen were varied as different ultrasound conditions used. Protein pattern from SDS-PAGE showed α1, α2, β and γ chains were major component, that was similar to that of ASC. The increasing of ultrasound amplitude increased the protein degradation and released small fraction with low MW when duration time increased. therefore, Therefore, ultrasound is an alternative process that increases productivity of acid soluble collagen. In addition, the ultrasound condition used should be optimized to maximize the efficiency of extraction process.

Keywords: Clown featherback, Fish skin, Collagen, Ultrasound, Extraction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาปัญหาพิเศษในหัวข้อ “ผลของการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย” ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ ดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีจากอาจารย์ที่ปรึกษา คือ ดร. สุพัตรา กาญจนประทุม ในการแนะนำ ให้ข้อเสนอแนะ ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัยตั้งแต่ขั้นตอนการวางแผนและการปฏิบัติงานจริง คอยติดตามดูการทำงานและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. สุพีรยา อาษา ที่ท่านได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบงานวิจัยและคอยให้คำแนะนำและให้การสนับสนุนอย่างดีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิทธิพงศ์ นลินานนท์ ที่ท่านให้การสนับสนุนในส่วนของอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย รวมถึงพี่ๆ นักศึกษาปริญญาโทที่สละเวลาช่วยเหลือให้ข้อมูลและคำแนะนำต่างๆ ที่ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอบคุณเพื่อนๆ ที่ให้การสนับสนุน คอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ รวมทั้งคอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอมอบประโยชน์อันเกิดจากงานวิจัยฉบับนี้แก่ครูบาอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน หากงานวิจัยฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

ปิณฑิรา อนันตลาภ
พีรยา ศรีสวัสดิ์
22 พฤษภาคม 2562

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ปลากราย	3
2.2 คอลลาเจน	4
2.3 อัลตราซาวด์	11
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	19
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	19
3.2 อุปกรณ์	20
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	21
3.4 วิเคราะห์ทางสถิติ	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	23
4.1 ผลผลิตคอลลาเจนคิดเป็นปริมาณของแข็ง	23
4.2 ปริมาณไฮดรอกซีโพลีน	24
4.3 รูปแบบโปรตีนคอลลาเจน	25
4.4 ความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน	26
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	28
5.1 สรุปผล	28
5.2 ข้อเสนอแนะ	28
บรรณานุกรม	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	32
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate Analysis)	33
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน	34
ภาคผนวก ค การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังปลากราย	37
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการละลายของคอลลาเจน	40
ประวัติผู้เขียน	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาปักเป้า หนังปลาวัว และหนังปลาคราฟ 4 สายพันธุ์	8
2.2	อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลา Bighead carp, silver carp และ grass carp	10
4.1	การเปลี่ยนแปลงของเอนทัลปี (ΔH) และอุณหภูมิสูงสุดก่อนการเสียสภาพธรรมชาติ (T_{max}) ของคอลลาเจนจากหนังปลากรายที่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดในสภาวะต่างๆ	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ปลากราย (Clown featherback)	3
2.2	โครงสร้างของโทรโปคอลลาเจน	5
2.3	การเรียงตัวของกรดอะมิโน	5
2.4	รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (PSC) จากหนังปลาสวาย	6
2.5	รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (PSC) จากหนังปลายี่สก	9
2.6	คลื่นความถี่ของอัลตราซาวด์ในช่วงต่างๆ	12
2.7	ลักษณะของฮอร์นชนิดต่างๆ	12
2.8	ระบบอัลตราซาวด์แบบโพรบ	13
2.9	การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์	15
2.10	ผลผลิตคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด(ASC) และอัลตราซาวด์ที่สภาวะต่างๆจากหนังปลายี่สก	17
4.1	ผลผลิตคอลลาเจนคิดเป็นปริมาณของแข็งที่สกัดได้จากหนังปลากราย *(Chitala ornate)* โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดในสภาวะต่างๆ	23
4.2	ปริมาณของไฮดรอกซีโพลีนที่สกัดได้จากหนังปลากราย *(Chitala ornate)* โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดในสภาวะต่างๆ	25
4.3	รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังปลากราย *(Chitala ornata)* ที่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดในสภาวะต่างๆ	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ

ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากปลากรายอย่างแผ่หลายแต่ยังไม่มีผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับหนังปลากรายมากนัก ปลาชนิดนี้มีเนื้อสีขาวและมีความสามารถในการเกิดเจลที่ดีดังนั้นจึงนิยมนำเนื้อปลากรายไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ทอดมันและลูกชิ้น ในระหว่างกระบวนการแล่เนื้อปลาจะมีหนังปลาที่ถือได้ว่าเป็นวัสดุเหลือทิ้งประมาณ 17-22% ของน้ำหนักทั้งหมด โดยวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้จะถูกส่งไปขายในโรงงานปลาป่นหรือโรงงานอาหารสัตว์ซึ่งมีมูลค่าต่ำ (Kittiphattanabawon และคณะ, 2015) เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับหนังปลากรายจึงนำหนังปลากรายมาสกัดคอลลาเจนถือว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับปลากรายได้ เนื่องจากคอลลาเจนมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านอาหาร ยา เครื่องสำอาง การเพาะเลี้ยงเซลล์ และการบริโภค มีการใช้คอลลาเจนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมใหม่ๆ เช่น ใช้เป็นตัวเติมเต็มผิวหนัง ใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อสัตว์ (Ye และคณะ, 2017) ซึ่งคอลลาเจนมีอยู่ในผิวหนัง เกล็ด กระดูก และครีบของปลา (Kim และคณะ, 2013) โดยทั่วไปคอลลาเจนมักสกัดมาจากหนังหมู และกระดูกวัวซึ่งใช้ระยะเวลาในการสกัดที่นาน นอกจากนี้วัวเป็นสัตว์ต้องห้ามในศาสนาซิกข์และฮินดู ส่วนคอลลาเจนจากหมูเป็นที่ต้องห้ามในศาสนาอิสลามและยิว ซึ่งฆ่าสัตว์ดังกล่าวต้องกระทำให้ถูกต้องตามหลักศาสนาอีกด้วย รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกยังคงมีความเสี่ยงจากไข้หวัดนก ทำให้ปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการสกัดและการจำแนกคุณลักษณะ รวมทั้งการใช้ประโยชน์คอลลาเจนจากสัตว์น้ำ (สิทธิพงศ์, 2013) และในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวข้องกับคอลลาเจนจากปลาน้ำจืด เช่น ปลายี่สก (Ali และคณะ, 2018) ปลาสลิด (สิทธิพงศ์, 2013) และปลาสวาย (Singh และคณะ, 2011) เป็นต้น แต่ยังไม่พบงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการสกัดและการจำแนกคุณลักษณะคอลลาเจนจากหนังปลากรายโดยใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัด

การศึกษาครั้งนี้มีการใช้อัลตราซาวด์ร่วมในการสกัด ซึ่งอัลตราซาวด์ได้รับการศึกษาและใช้กันอย่างกว้างขวางในการปรับปรุงการผสม การอบแห้ง การทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน และการสกัดในอุตสาหกรรมอาหาร กลไกของการอัลตราซาวนด์ในระบบของเหลวส่วนใหญ่เกิดจากการปล่อยคลื่นเสียงก่อให้เกิดแรงดันสูงและต่ำทำให้เกิดการสั่นสะเทือน (Ali และคณะ, 2018) ส่งผลให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในวัสดุที่นำมาสกัดได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนั้นคลื่นอัลตราซาวด์ยังไปทำลายพื้นผิวที่บริเวณผนังเซลล์และภายในเซลล์ทำให้สารที่ต้องการสกัดสามารถออกมาได้ง่ายขึ้น ซึ่งการนำอัลตราซาวด์มาใช้ในการสกัดจะทำให้ลดระยะเวลาในการสกัด เพิ่มปริมาณผลผลิต แต่ยังคงคุณสมบัติที่ดีไว้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาผลผลิต และคุณลักษณะของการใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากรายที่มีต่อผลผลิต และคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้อัลตราซาวด์ในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย

1.3.2 เพิ่มมูลค่าของหนังปลากรายที่ได้จากกระบวนการตัดแต่งเนื้อปลา

1.3.3 สามารถวางแผนการทำงานอย่างเป็นระบบ และใช้เครื่องมือต่างๆ สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพและผลผลิตของคอลลาเจนได้อย่างถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลากราย

ปลากรายมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Chitala ornata* ชื่อสามัญภาษาอังกฤษคือ clown featherback หรือ Spotted knifefish ชื่อท้องถิ่น ปลาตองกราย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ปลาหางแพน (ภาคเหนือ) ลักษณะทั่วไปของปลากราย มีลักษณะลำตัวยาวบาง แบนข้าง ส่วนหัวมีขนาดเล็กเว้าเป็นสันโค้งและแยกออกจากลำตัวเห็นชัดเจนเหนือครีบก้นจะมีจุดสีดำค่อนข้างใหญ่ ประมาณ 5 – 10 จุดเรียงเป็นแถว สีของลำตัวเป็นสีขาวเงินส่วนหลังมีสีคล้ำกว่าส่วนท้อง ขนาดของปลากราย ที่พบส่วนใหญ่ยาวประมาณ 70–75 ซม. มีลายสีเทาดำประมาณ 10–15 แถบ พาดขวางลำตัว เมื่ออายุประมาณ 80 วัน ลายจะเลือนหายไปและกลายเป็นจุดสีดำแทน เกล็ดมีขนาดเล็กละเอียด ครีบต่างๆ ทุกครีบเป็นก้านครีบอ่อนทั้งหมด ครีบท้องเล็กมาก ครีบก้นและครีบหางเชื่อมติดกันรวมเป็นครีบเดียวกัน บริเวณสันท้องมีหนามคล้ายฟันเลื่อย 2 แถว จำนวนประมาณ 37-45 คู่ ปลากรายเป็นปลาน้ำจืดที่พบมากในประเทศไทย อินโดนีเซีย อินเดีย มาเลเซียและพม่า ในประเทศไทยพบอาศัยในแม่น้ำลำคลอง หนองและบึงทั่วประเทศ ยกเว้นภาคใต้ (นนณ์, 2554)

ปลากรายเป็นปลาน้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เนื้อปลากรายมีรสชาติดี สามารถนำมาปรุงอาหารได้หลายชนิด เช่น ทอดมันปลากราย ลูกชิ้นปลากราย เชิงปลากรายทอดกระเทียม เป็นต้น ทำให้ราคาจำหน่ายปลากรายในท้องตลาดค่อนข้างมีราคาแพงประมาณกิโลกรัมละ 70-80 บาท ส่วนเนื้อปลาขูดราคากิโลกรัมละ 150 บาท ส่วนหนังปลากรายถือเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการขูดเนื้อปลากราย มีการเอาหนังปลามาบริโภคในรูปแบบหนังปลาทอดกรอบในบางพื้นที่ของไทย นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยและการศึกษาสมบัติต่างๆของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลากราย ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับหนังปลากราย

ภาพที่ 2.1 ปลากราย (Clown featherback)
ที่มา: นนณ์ (2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

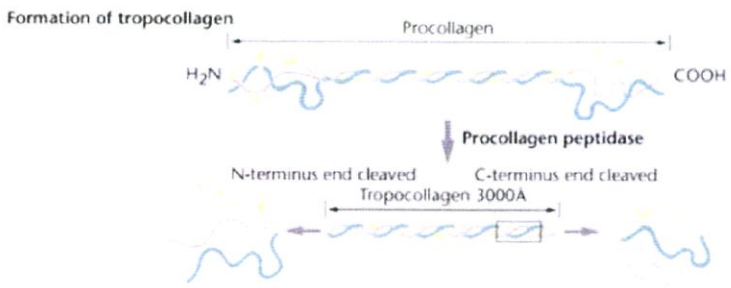
2.2 คอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบมากในร่างกายของสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งมีประมาณ 30% ของโปรตีนทั้งหมด โดยจะพบมากในผิวหนัง เอ็น กระดูก และกระดูกอ่อน โดยที่ปริมาณคอลลาเจนจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อและอายุของสัตว์ (Balian และ Bowes, 1977) ส่วนลักษณะของคอลลาเจนโดยทั่วไปคล้ายคลึงกันจะต่างกันเพียงเล็กน้อยในองค์ประกอบของกรดอะมิโน ซึ่งทำให้คุณสมบัติโดยทั่วไปของคอลลาเจนต่างกันไป ปัจจัยสำคัญที่พบว่ามีอิทธิพล คือ สายพันธุ์และชนิดของเนื้อเยื่อ (มาลัยวรรณ และ วรรณวิบูลย์, 2549)

2.2.1 โครงสร้างของคอลลาเจน

โครงสร้างพื้นฐานของคอลลาเจนที่รู้จักกันดีคือ โทรโปคอลลาเจน (tropocollagen) ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 3 สาย ซึ่งแต่ละสายเรียกว่า สายแอลฟา (α-chain) แต่ละสายของโพลีเปปไทด์จะวนเป็นเกลียวไปทางซ้าย (left-hand helix) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายโพลีเปปไทด์แต่ละสาย จากนั้นสายโพลีเปปไทด์ทั้ง 3 สายจะพันรอบกันเองเป็นเกลียววนขวา (right-hand helix) (Singh และคณะ, 2011) และแต่ละสายจะมีกรดอะมิโนมากกว่า 1000 ตัวต่อกัน โดยทั่วไปจะประกอบด้วย กรดอะมิโนไกลซีน (Glycine: Gly) ประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมดในโมเลกุลคอลลาเจน และมีกรดอิมิโน (imino acid) ประมาณ 1 ใน 4 โดยแยกเป็นโพรลีนประมาณ 12% และ ไฮดรอกซีโพรลีนประมาณ 11% (Ward และ Courts, 1977) ซึ่งลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนจะมีลักษณะซ้ำๆกันของ -Gly-X-Y- โดย X และ Y มักเป็นโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนตามลำดับ (Singh และคณะ, 2011) การที่โครงสร้างของคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเกลียว โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรง คงตัวมากขึ้น และเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ยาก ทำให้คอลลาเจนไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งโทรโปคอลลาเจนจะเรียงตัวขนานกันโดยมีแรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander Waals force) และไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) เชื่อมระหว่างโทรโปคอลลาเจนทำให้เกิดลักษณะเป็นเส้นใยของคอลลาเจน ซึ่งความแข็งแรงของคอลลาเจนโมเลกุลยังเกิดจากการสร้างพันธะเชื่อมต่อกันทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล (intra และ inter molecular cross linkage) (Foegeding และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว เรียกทีโลเปปไทด์โซน (telopeptide zone) (Creighton, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของโทรโปคอลลาเจน
ที่มา: Bhattacharjee และ Bansal (2005)

ภาพที่ 2.3 การเรียงตัวของกรดอะมิโน
ที่มา: Shoulders และ Rains (2009)

2.2.2 ชนิดของคอลลาเจน

ปัจจุบันสามารถแบ่งคอลลาเจนออกเป็น 25 ชนิด โดยแบ่งตามลำดับของกรดอะมิโน มวลโมเลกุล ส่วนประกอบของหน่วยย่อย (subunit) ความยาวของสายฮีลิกซ์ คุณสมบัติ และขนาดของส่วนที่ไม่เป็นฮีลิกซ์ (non-helix portion) (Friess, 1998) อีกทั้งแบ่งตามข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ หรือ โปรตีน (Olsen และคณะ, 2003)

คอลลาเจน type I พบได้เป็นส่วนใหญ่ในสัตว์ชั้นสูง ในส่วนของหนัง เอ็น และกระดูก ซึ่งประกอบด้วย 3 สาย ได้แก่ สาย แอลฟา1 จำนวน 2 สาย และ แอลฟา2 จำนวน 1 สาย ซึ่งสาย แอลฟา1 และ แอลฟา2 จะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้อาจพบสาย แอลฟา1 จำนวน 3 สายซึ่งพบได้น้อยมาก

คอลลาเจน type II พบได้ส่วนใหญ่ในกระดูกอ่อน ประกอบด้วยสาย แอลฟา1 จำนวน 3 สาย ซึ่งเชื่อกันว่ามีลักษณะคล้ายสาย แอลฟา1

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

สำหรับคอลลาเจนชนิดอื่นๆจะพบในปริมาณที่น้อยมากและมีการเชื่อมโยงกับโครงสร้างทางชีววิทยาที่จำเพาะ ในการศึกษาส่วนใหญ่นิยมศึกษาคอลลาเจน type I เนื่องจากมีปริมาณมาก และมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะทางการแพทย์

2.2.3 คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (Acid soluble collagen)

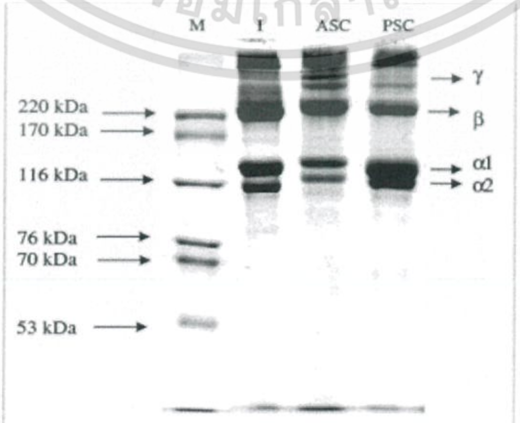
คอลลาเจนสามารถละลายในสารละลายกรดเจือจาง เช่น กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ กรดจะมีประสิทธิภาพในการสกัดคอลลาเจนมากกว่าการใช้สารละลายเกลือ พันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดเจือจางแล้วทำให้ประจุบนโทรโปคอลลาเจนผลักกัน ทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัว (Friess, 1998) คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรดเจือจางจะเป็นคอลลาเจน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

Ahmad และคณะ (2010) ได้รายงานผลของคอลลาเจนที่ละลายในกรด (acid soluble collagen) จากหนังปลาวัวว่าปริมาณคอลลาเจนที่ได้หลังการทำแห้งแบบระเหิด เท่ากับ 4.19 % น้ำหนักเปียก และเมื่อทดสอบโดยใช้ SDS-PAGE พบว่า คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาวัวมีสายแอลฟ่า 2 สาย ได้แก่ แอลฟ่า1 และแอลฟ่า2 นอกจากนี้ยังพบว่ามีสายโซ่บีต้าเป็นส่วนประกอบ จะแสดงถึงการ crosslink ของโมเลกุลคอลลาเจน จากการทดสอบดังกล่าวแสดงว่ารูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังปลาวัวเป็นคอลลาเจน type I

นอกจากนี้นันทพร (2550) ได้รายงานผลที่คล้ายคลึงกันจากการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาสีกูด โดยใช้ SDS-PAGE พบว่า คอลลาเจนที่ได้เป็นคอลลาเจน type I

2.2.4 คอลลาเจนที่ละลายด้วยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin soluble collagen)

จากการทดลองของ Singh และคณะ (2011) ได้รายงานผลของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเปปซินสกัดจากหนังปลาสวาย (striped catfish) โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาสวายประกอบด้วยสายแอลฟ่า1 แอลฟ่า2 และสายบีต้า ดังนั้นคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับคอลลาเจนจากหนังลูกวัว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.4 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (PSC) จากหนังปลาสวาย แถบ M และ I แสดงถึงแถบโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง และคอลลาเจน type I จากหนังวัวตามลำดับ
ที่มา: Singh และคณะ (2011)

Wang และคณะ (2009) ได้รายงานผลของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด และเปปซินสกัดจากหนังปลาดุกมาเลเซีย (Malaysian catfish) ว่าปริมาณผลคอลลาเจนที่ได้หลังการทำแห้งแบบระเหิดเท่ากับ 26.69±0.54% ฐานเปียก จากการทดสอบโดยใช้ SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาดุกมาเลเซียประกอบด้วยพันธะภายในโมเลกุล และระหว่างโมเลกุล คือบีต้า (dimers) และ แกมม่า (trimers) ดังนั้นคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาดุกมาเลเซียเป็นคอลลาเจนชนิดเดียวกับคอลลาเจนจากหนังวัวประกอบด้วยสายแอลฟ่า1 จำนวน 2 สาย และสายแอลฟ่า 2 จำนวน 1 สายซึ่งตรงกับคุณลักษณะของคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นคอลลาเจนหลักที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Muyonga และคณะ, 2004)

2.2.5 คุณลักษณะของคอลลาเจน

2.2.5.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโน (Amino acid composition)

จากการศึกษาของ Huang และคณะ (2011) ในการสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเปปซินสกัดจากหนังปลาปักเป้า (balloon fish) ได้รายงานผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนของคอลลาเจนที่ได้ว่ามีปริมาณไกลซีนมากที่สุด ประมาณ 34-35% ของกรดอะมิโนทั้งหมด และมีเมทไธโอนีน, ไอโซลิวซีน ไทโรซีน และฮีสทิดีนในปริมาณต่ำ และมีปริมาณกรดอิมิโน 179 residues/1000 residues ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่สกัดจากปลาชนิดอื่น เช่น brown backed, hake, squid and channel catfish (Liu และคณะ, 2007; Senaratne และคณะ, 2006)

Liu และคณะ (2014) ได้รายงานผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจนจากหนังและเกล็ดของปลาคราฟ 4 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่า คอลลาเจนที่สกัดจากปลาคราฟ ทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นคอลลาเจน type I มีไกลซีนเป็นกรดอะมิโนที่มีปริมาณมากสุด 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด พบโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนในปริมาณสูง แต่มีไทโรซีน และฮิสทิดีนในปริมาณต่ำ จากการรายงานของ Yata และคณะ (2001) คอลลาเจน type I จะพบอะลานีน ลิวซีน และไฮดรอกซีไลซีนในคอลลาเจน ดังนั้นคอลลาเจนที่สกัดจากคราฟ ทั้ง 4 สายพันธุ์จึงเป็นคอลลาเจน type I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาปักเป้า หนังปลาวัว และหนังปลาคราฟ 4 สายพันธุ์

กรดอะมิโน	ปลาปักเป้า	ปลาวัว	ปลาคราฟ 4 สายพันธุ์			
			Bighead carp	Silver carp	Black carp	Grass carp
ไกลซีน	353	321	325	328	314	326
โพรลีน	108	109	115	112	133	105
ไฮดรอกซีโพรลีน	71	81	66.1	69.4	68.9	87.2
กรดแอสปาติก	46	45	48.8	47.6	48.6	49.3
ซีรีน	33	33	34.7	35.1	37.0	34.2
กรดกลูตามิก	69	74	80.3	79.3	77.9	78.7
ฮีสทิดีน	6	6	4.3	3.8	3.9	3.8
อาร์จีนีน	52	53	54.7	54.6	53.4	52.9
ธรีโอนีน	24	27	26.3	25.9	24.7	24.7
อะลานีน	135	141	122	125	119	125
ซีสเตอีน	0	0	0.2	0.1	0.2	0.3
ไทโรซีน	4	4	3.4	3.1	3.4	2.7
วาลีน	21	21	21.5	20.4	21.7	21.1
เมทไธโอนีน	12	13	16.0	15.7	14.4	13.0
ไลซีน	28	27	29.4	29.2	28.9	27.5
โอโซลิวซีน	9	9	12.2	12.3	12.1	11.8
ลิวซีน	17	17	23.0	21.6	21.7	21.0
ฟีนิลอะลานีน	13	13	14.9	14.5	14.7	13.6
ไฮดรอกซีไลซีน	0	5	2.8	2.6	2.4	2.4
รวมทั้งหมด	1000	1000	1000	1000	1000	1000

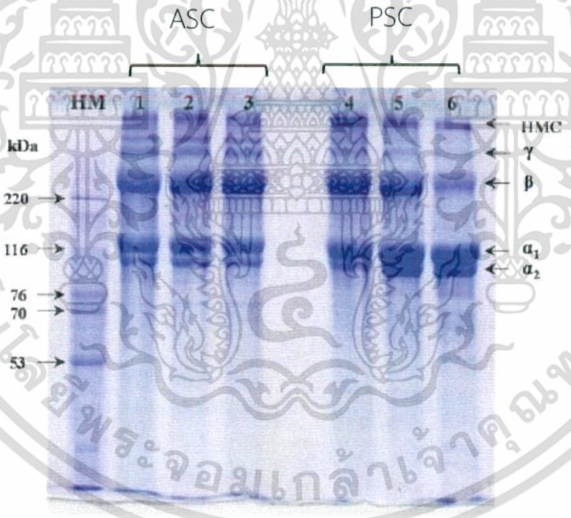
ที่มา: Huang และคณะ (2011); Ahmad และคณะ (2010); Liu และคณะ (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5.2 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน

รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนสามารถวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate -Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล สามารถใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในตัวอย่าง SDS เป็นสารพวก detergent โดย SDS เมื่อรวมกับโปรตีนจะทำให้โครงสร้างของโปรตีนที่มี SDS จับอยู่มีประจุเป็นลบ และสายของโปรตีนยืดตัวออกจากสภาพธรรมชาติกลายเป็นแท่ง และอัตราส่วนประจุ ต่อมวลของโมเลกุลของโปรตีนทุกชนิดมีคาเท่ากัน ฉะนั้นใน SDS-PAGE นี้โปรตีนจึงแยกกันด้วยความแตกต่างของขนาด (มวลโมเลกุ) เท่านั้น เมื่อใส่ SDS และ Mercaptoethanol จะทำลายพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างหน่วยย่อยของโปรตีน SDS-PAGE ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุล และจำนวนหน่วยย่อยของโปรตีน โดยทั่วไปโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (สายทิพย์, 2555)

จากการศึกษาของ Ali และคณะ (2018) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลายี่สก ผลจาก SDS-PAGE พบว่า คอลลาเจนที่ได้เป็นคอลลาเจน type I ซึ่งประกอบด้วย สายแอลฟ่า1, แอลฟ่า 2, สายแกมม่า และสายบีต้า



ภาพที่ 2.5 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (PSC) จากหนังปลายี่สก

แถบที่ 1 ASC, แถบที่ 2 และ 3 UASC amplitude 50 และ 80% ตามลำดับ

แถบที่ 4 PSC, แถบที่ 5 และ 6 UPSC ที่เปปซินความเข้มข้น 0.5 และ 1% ตามลำดับ

ที่มา: Ali และคณะ (2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Huang และคณะ (2011) ได้รายงานผลการวิเคราะห์คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด และเปปซินสกัดจากหนังปลาปักเป้า (balloon fish) พบว่าปริมาณผลคอลลาเจนที่ได้หลังการทำแห้งแบบระเหิด เท่ากับ 4% ฐานแห้ง และจากการทดสอบโดยใช้ SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาปักเป้าประกอบด้วยสายแอลฟา1 แอลฟา2 และสายบีต้า ดังนั้นคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับคอลลาเจนจากหนังลูกวัว

2.2.5.3 ความคงตัวต่อความร้อน

จากการศึกษาของ Ahmad และคณะ (2010) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลา unicorn leatherjacket โดยใช้เทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) ผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่สูงที่สุดที่ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพ (T_{max}) คือ 27.2 °C ซึ่งมีค่าน้อยกว่าคอลลาเจนจากหนังลูกวัว (40.8 °C) (Kittiphattanabawon และคณะ, 2005) โดยค่า Tmax ที่ต่ำสัมพันธ์กับปริมาณกรดอิมิโนในหนังปลาวัวที่ต่ำกว่าในหนังลูกวัว โดยปริมาณกรดอิมิโนที่สูงกว่าจะทำให้ความคงตัวต่อความร้อนสูงกว่าด้วย (Zhang และคณะ, 2007)

จากการศึกษาของ Liu และคณะ (2014) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังและเกล็ดปลาคราฟ 4 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) ผลการทดลองพบว่า T_{max} จากหนังปลาคราฟ ทั้ง 4 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 34.1-35.6°C ซึ่งปลาชนิดอื่นมีค่า T_{max} ต่ำกว่า 30°C เช่น หนังปลาหมึกกระดอง (27.0°C) (Nagai และคณะ, 2001) หนังปลาแซลมอน (19.4°C) หนังปลาแมคเคอเรล (26.1°C) หนังปลากะพงข้างเหลือง (28.7°C) (Kittiphattanabawon และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามหาก ASC ที่มีค่า T_{max} สูงจะมีศักยภาพคล้ายคอลลาเจนที่สกัดจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Pati และคณะ, 2010) ดังนั้นอุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาคราฟ4 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง 34.1-35.6°C

ตารางที่ 2.2 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลา bighead carp, silver carp, black carp และ grass carp

Species	T_{max} of skin ASC	T_{max} of scale ASC
Bighead carp	35.9 ± 0.1^{bA}	35.6 ± 0.2^{aA}
Silver carp	35.9 ± 0.2^{bA}	34.1 ± 0.0^{dB}
Black carp	35.6 ± 0.2^{bA}	35.2 ± 0.0^{bA}
Grass carp	36.4 ± 0.1^{aA}	34.9 ± 0.0^{cB}

ที่มา: Liu และคณะ (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

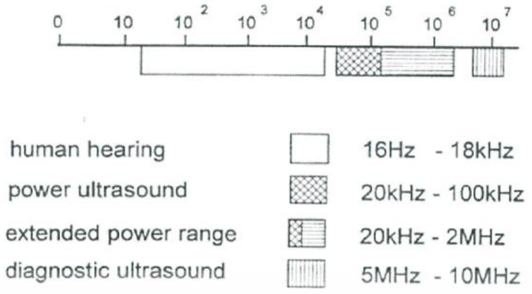
Huang และคณะ (2011) รายงานT_{max} ของคอลลาเจนจากหนังปลาปักเป้าที่ 29.64°C ซึ่งค่าต่ำกว่า T_{max} ของคอลลาเจนจากสัตว์บก เช่นหนังลูกวัว 37°C (Ogawa และคณะ, 2003) และหนังหมู 37°C (Nagai และคณะ, 2002) ซึ่งค่า T_{max} ที่ต่างกันสัมพันธ์กับอุณหภูมิของแหล่งที่อยู่อาศัยและอุณหภูมิร่างกายที่ต่างกัน (PiและGross, 1960) จากการรายงานของ Sikorski และคณะ (1984) ปริมาณกรดอิมิโนมีความสัมพันธ์กับความคงตัวต่อความร้อนของโปรตีน เนื่องด้วยคอลลาเจนจากหนังลูกวัวมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน 94 residues ต่อ 1000 residues (Ogawa และคณะ, 2003) แต่ในปลาปักเป้ามีปริมาณ 71 residues ต่อ 1000 residues

2.3 อัลตราซาวด์

2.3.1 ความหมายของคลื่นอัลตราซาวด์

คลื่นอัลตราซาวด์หรือคลื่นอัลตราซาวด์(ultrasonic waves) หมายถึงพลังงานที่เกิดจากคลื่นเสียง ที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่า (Hoover, 2000) หรือหมายถึงคลื่นความดัน (pressure waves) ที่มีความถี่ (frequency) สูงกว่าคลื่นเสียงปกติ (สูงกว่า 20,000 กิโลเฮิร์ตซ์, kHz) ส่วนคำว่าอัลตราซาวด์(ultrasonics) หรือโซนิเคชันส์ (sonications) หมายถึงการศึกษาเกี่ยวกับคลื่นเสียงหรืออัลตราซาวด์ในช่วงความถี่ดังกล่าวซึ่งมนุษย์ไม่สามารถได้ยิน โดยทั่วไปแล้วคลื่นเสียง (sound) ที่มนุษย์ได้ยินนั้นเกิดจากการสั่นสะเทือนของตัวกลางที่ยืดหยุ่น(elastic medium) ที่มีความถี่อยู่ในช่วง 20 – 20,000 kHz คลื่นเสียงผ่านเข้าสู่ตัวกลางที่ยืดหยุ่น ในลักษณะที่เป็นคลื่นตามยาว (longitudinal waves) แต่คลื่นเสียงที่ผ่านเข้าไปภายในวัตถุที่เป็นของแข็งอาจอยู่ในลักษณะที่เป็นคลื่นตามยาวหรือคลื่นตามขวาง (transverse waves) ในการศึกษา การใช้ประโยชน์จากอัลตราซาวด์ตั้งแต่ต้นจนถึงปัจจุบัน พบว่ามีการนำอัลตราซาวด์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหรือในกระบวนการแปรรูปอาหาร โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ การใช้อัลตราซาวด์กำลังต่ำและความถี่สูง (low power and high frequencies) ซึ่งใช้ในด้านการวิเคราะห์ (diagnostic ultrasound) เป็นส่วนใหญ่และการใช้อัลตราซาวด์กำลังสูงและความถี่ต่ำ (high power and low frequencies) หรือที่เรียกว่าพาวเวอร์อัลตราซาวด์(power ultrasound) ที่มักนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร (Mason,1998) คลื่นความถี่ของอัลตราซาวด์ในช่วงต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.6 คลื่นความถี่ของอัลตราซาวด์ในช่วงต่าง ๆ

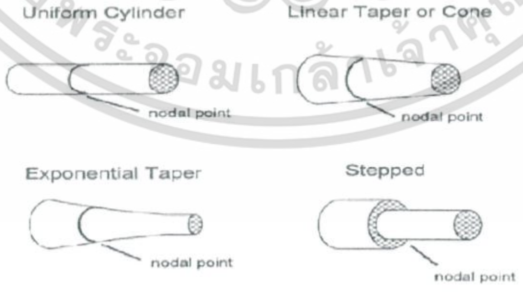
ที่มา : Mason (1998)

การใช้พาวเวอร์อัลตราซาวด์ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ทำให้เกิดผลต่อคุณสมบัติทางกลและทางเคมีของอาหารเนื่องจากคลื่นดังกล่าวทำให้เกิดปรากฏการณ์แคปวิเตชัน (cavitation) และส่วนมากใช้คลื่นในช่วงความถี่ 20 – 40 kHz ซึ่งเป็นความถี่ที่สร้างขึ้นจากอุปกรณ์อัลตราซาวด์ทั่วไปที่ใช้ในการทำความสะอาด การทำให้เซลล์แตกและในการขึ้นรูปพลาสติก เป็นต้น

2.3.2 ระบบอัลตราซาวด์

2.3.2.1 ระบบอัลตราซาวด์แบบโพรบ (ultrasonic probe systems)

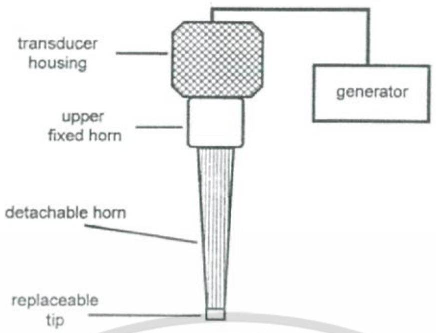
ในการขยายพลังงานหรือคลื่นเสียงที่เกิดขึ้นจากทรานส์ดิวเซอร์นั้นโดยทั่วไปจะนำทรานส์ดิวเซอร์มาต่อเข้ากับอุปกรณ์ที่เรียกว่าฮอร์น (horn) ลักษณะของฮอร์นจะมีความแตกต่างกันออกไปดังภาพที่ 2.7 โดยฮอร์นส่วนใหญ่จะให้ขนาดของความยาวคลื่นครึ่งหนึ่งหรือเป็นพหุคูณกับความยาวของคลื่นเสียงของวัสดุที่นำมาผลิต ระบบอัลตราซาวด์แบบโพรบ



ภาพที่ 2.7 ลักษณะของฮอร์นชนิดต่างๆ

ที่มา : Mason (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 ระบบอัลตราซาวด์แบบโพรบ
ที่มา : Mason (1998)

แอมพลิจูดที่สร้างขึ้นจากระบบนี้จะขึ้นกับรูปร่างลักษณะของฮอร์น สำหรับฮอร์นที่มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอก (uniform cylinder) นั้นแอมพลิจูดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ฮอร์นจะทำหน้าที่ขยายหรือเพิ่มการส่งถ่ายพลังงานเสียง ขนาดความยาวคลื่นที่ได้จากตัวขยาย (amplifier) สามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นผิวหน้าตัดในฮอร์นระหว่างสองพื้นที่คือ driven face (D) และ emitting face (d) ตัวอย่างเช่นในฮอร์นที่มีรูปร่างเป็น exponential หรือ linear tapered (cone) (ภาพที่ 2.7 บนขวาหรือล่างซ้าย) จะมีอัตราส่วนเท่ากับ D/d ในขณะที่ฮอร์นที่มีลักษณะเป็น stepped (ภาพที่ 2.7 ล่างขวา) จะมีอัตราส่วนเท่ากับ (D/d)2 ซึ่งจะเห็นว่าฮอร์นแบบ stepped จะมีความสามารถในการขยายสัญญาณได้สูงกว่าเสมอ แต่เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงความเสียหายจากความเค้นภายในตัววัตถุ (internal stress)อัตราส่วนระหว่าง D/d จะต้องมีค่าไม่สูงจนเกินไป ในทางปฏิบัติขนาดของพลังงานสูงสุดที่ได้จากแหล่งกำเนิดพลังงานนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญสองส่วน ได้แก่ คุณสมบัติของวัตถุที่ใช้ในการผลิตทรานส์ดิวเซอร์และพื้นผิวที่ปลดปล่อยคลื่น (emitting surface) ในส่วนของวัสดุที่นำมาใช้ผลิตทรานส์ดิวเซอร์นั้น นิยมใช้วัสดุที่สามารถยืดและคืนตัวกลับได้ดี เช่นไทเทเนียม (titanium) หรืออะลูมิเนียมอัลลอย (aluminium alloy) ซึ่งวัตถุทั้งสองชนิดมีความทนต่อการล้าเนื่องมาจากแรงกล แต่อะลูมิเนียมอัลลอยนั้นไม่เหมาะสมที่จะสัมผัสกับของเหลวที่เกิดปฏิกิริยาแคปติเวชันเนื่องจากถูกกัดกร่อนได้ง่าย จึงควรใช้วัตถุพวกไทเทเนียมอัลลอยแทน สำหรับพื้นผิวที่ปลดปล่อยคลื่นนั้นพบว่าพื้นที่ขนาดเล็กจะให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่า แต่ที่แอมพลิจูดสูงจะมีข้อจำกัดเนื่องจากฟองอากาศที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวหน้าจากปฏิกิริยาแคปวิเตชันจะรบกวนการส่งถ่ายของพลังงานไปยังของเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 เทคนิคการใช้คลื่นอัลตราซาวด์

เทคนิคหรือวิธีการในการใชคลื่นอัลตราซาวด์สำหรับการใช้ประโยชน์ต่างๆ สามารถแบ่งเป็นหัวข้อต่างๆ ได้ดังนี้

2.3.3.1 การทำให้เกิดการสั่นโดยตรง เช่นใช้ในการทำความสะอาดพื้นผิวหรือในการผสมต่างๆ

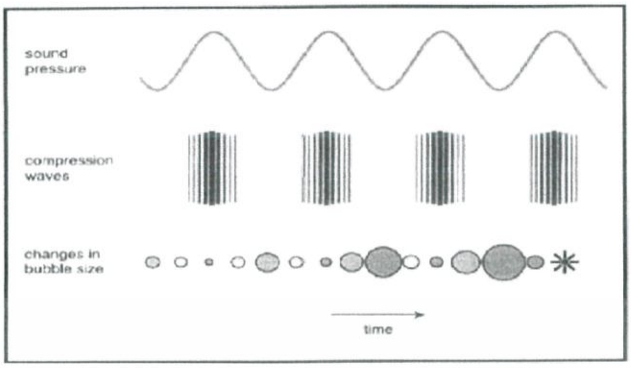
2.3.3.2 เทคนิคพัลสเอคโค (the pulse-echo ultrasound) ซึ่งได้รับการพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1940เพื่อใช้ในการตรวจสอบตำหนิของโลหะ เทคนิคนี้มีหลักการที่ว่าทรานสดิวเซอร์จะสัมผัสกับตัวอย่าง จากนั้นปล่อยคลื่นอัลตราซาวด์เป็นระยะๆ ไปยังตัวอย่าง ถ้าคลื่นอัลตราซาวด์ที่ถูกปล่อยเข้าไปภายในตัวอย่างไปกระทบกับความหนาแน่น (density) หรือความยืดหยุ่น (elasticity) ที่แตกต่างออกไปจากเดิมจะทำให้มีพลังงานบางส่วนสะท้อนกลับมายังทรานสดิวเซอร์ ซึ่งสัญญานที่ส่งกลับมาจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสัญญานไฟฟ้า จากนั้นจะถูกขยาย (amplified) ปรับแต่ง(conditioned) และแสดงภาพ (displayed) ของโครงสร้างหรือลักษณะภายในดังกล่าวออกมาให้เห็นได้ เทคนิคนี้ใช้ในการควบคุมการไหลของของไหล วัดความหนาของชั้นไขมันในสัตว์ วัดความหนาของวัสดุต่างๆ รวมทั้งใช้ในการวิเคราะห์ทางการแพทย์

2.3.3.3 การใช้ผลที่เกิดจากปรากฏการณ์ดอปเปลอร์ (Doppler effect tap) เทคนิคนี้ใช้ในการตรวจสอบการเคลื่อนไหวและทิศทางการเคลื่อนที่ โดยใช้หลักการที่ว่าความถี่ของเสียงสะท้อน(the echoes) จากสิ่งที่เคลื่อนที่จะค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงไปตามความถี่ของสัญญานที่ปล่อยออกมาเป็นจังหวะเนื่องจากระยะทางไปยังจุดหมายเกิดการเปลี่ยนแปลง เมื่อจุดหมายเคลื่อนที่เข้ามาใกล้หรือเคลื่อนที่ไกลออกจากทรานสดิวเซอร์ จะทำให้ความถี่ที่ตรวจวัดได้ใหญ่ขึ้นหรือเล็กลงกว่าความถี่ที่ส่งผ่านออกมา (เช่นเดียวกับการที่หูของเราได้ยินเสียงหวูดของรถไฟเมื่อรถไฟเคลื่อนที่เข้ามาใกล้หรือเคลื่อนที่ไกลออกไป) ซึ่งเทคนิคนี้ใช้ในการวิเคราะห์ทางด้านการแพทย์ เช่นการตรวจอัตราการไหลของเลือดและการตรวจหัวใจ

2.3.4 ปรากฏการณ์แคปวิเตชัน (Cavitation)

ปรากฏการณ์แคปวิเตชันหมายถึงกระบวนการที่เกิดขึ้นในตัวกลาง หรือสารละลายที่ได้รับคลื่นเสียงอัลตราซาวด์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพ (จากแรงกล)เนื่องมาจากฟองอากาศ (bubbles) ที่เกิดขึ้น ซึ่งการที่ฟองอากาศเกิดขึ้นได้นั้นเนื่องมาจากโครงสร้างของของเหลวที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์จะถูกบีบอัด (compress) และคลายตัว (stretch) ซ้ำไปมาเป็นจำนวนหลายพันรอบ ทำให้เกิดฟองอากาศขึ้น และฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายในของเหลวนี้จะสัมผัสกับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตราซาวด์เป็นระยะและเกิดการแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างกัน (Atchley and Crum, 1998) เป็นผลให้ฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้นไปเรื่อยๆ จนกระทั่งแตกออกในที่สุดแสดงดังภาพที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.9 การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์
ที่มา : Suslick (1994)

Frizzell (1988) รายงานว่าแคปวิเตชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่แคปวิเตชันแบบถาวร (stable cavitation) และแคปวิเตชันแบบชั่วคราว (transient cavitation) ซึ่งแต่ละแบบจะมีผลทำให้พฤติกรรมหรือลักษณะของฟองแก๊สที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์แตกต่างกันออกไป โดยแคปวิเตชันแบบถาวรจะเกิดขึ้นเมื่อฟองอากาศหรือฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่ง (oscillate) เมื่อได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นจำนวนหลายรอบของการสั่นแต่ไม่เกิดการแตกของฟองอากาศหรือฟองแก๊สดังกล่าว ซึ่งฟองอากาศหรือฟองแก๊สนี้อาจจะเพิ่มขนาดขึ้นจนถึงขนาดเรโซแนนซ์ (resonance size) (เป็นขนาดของฟองแก๊สที่มีความถี่ธรรมชาติเท่ากันกับความถี่ในการสั่นแบบบังคับ) ส่วนแคปวิเตชันแบบชั่วคราวนั้น เกิดขึ้นในระยะการบีบอัดของฟองแก๊ส (compression phase) ในของเหลวที่ได้รับความเครียด (tension stress) ที่เกิดขึ้นขณะเริ่มเกิดการขยายตัวของฟองแก๊ส ซึ่งมีผลทำให้การแตกของฟองแก๊สเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว หรืออาจเกิดจากฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่งและขยายขนาดเพิ่มขึ้นในลักษณะคงที่ในระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะแตกออกอย่างรวดเร็วเมื่อฟองแก๊สนั้นขยาขนาดขึ้นเมื่อถึงขนาดที่จำเพาะ

Sala และคณะ. (1995) รายงานว่าในสภาวะที่ฟองอากาศแตกนั้นพบว่าทำให้เกิดอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 5,000 เคลวิน (K) และความดันสูงถึง 2,000 atm ในบริเวณจุดที่เกิดคลื่นกระแทก (shock waves) ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการเกิดการขยายและหดตัวของฟองแก๊สนั้น จะเกิดสมดุลขึ้นระหว่างความดันไอภายในและภายนอกฟองแก๊สและพื้นที่ผิวของฟองแก๊สขณะขยายตัวจะมีมากกว่าพื้นที่ผิวของฟองแก๊สขณะหดตัว จึงเป็นผลให้การซึมผ่านของแก๊สในขณะที่ขยายตัวเกิดขึ้นได้มากกว่าและฟองแก๊สนี้จะขยายตัวเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนรอบความถี่เพิ่มขึ้น โดยอัตราส่วนของอัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะขยายตัวต่ออัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะถูกอัดจะเพิ่มมากขึ้นในแต่ละรอบ จนกระทั่งฟองแก๊สมีขนาดเรโซแนนซ์ ซึ่งทำให้ช่องว่างภายในฟองแก๊สมีขนาดโตขึ้นอย่างรวดเร็วภายในหนึ่งรอบของการสั่น และเนื่องจากพลังงานที่ได้รับจากคลื่นอัลตราซาวด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่เพียงพอในการคงสภาวะของแก๊สหรือไอ จึงทำให้เกิดการควบแน่น (condensation) ขึ้นทันทีทันใด โดยโมเลกุลที่ควบแน่นนั้นจะชนซึ่งกันและกันอย่างรุนแรง ทำให้เกิดคลื่นกระแทกขึ้นและเกิดจุดหรือบริเวณเล็กๆ ที่มีอุณหภูมิและความดันที่สูงมาก (Suslick, 1988) และเป็นที่เชื่อกันว่าปรากฏการณ์นี้เป็นปรากฏการณ์ที่สำคัญที่เกิดในระหว่างที่ของเหลวได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ซึ่งทันทีที่ฟองแก๊สหรือฟองอากาศแตกจะเกิดการปลดปล่อยพลังงานที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีหรือสร้างวิถีของปฏิกิริยา (reaction pathway) หรือทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากปฏิกิริยาเดิมจากสภาวะปกติ

2.3.5 ผลของคลื่นอัลตราซาวด์ต่อเอนไซม์และโปรตีน

Sala และคณะ (1995) รายงานว่ามีการรวบรวมผลการศึกษาในเรื่องผลของคลื่นอัลตราซาวด์ต่อเอนไซม์และองค์ประกอบของอาหารอื่นๆ นั้นมีมานานแล้วโดยประมาณ 70 ปีที่ผ่านมา ซึ่งต่อมาในภายหลังพบว่าคลื่นอัลตราซาวด์สามารถทำให้โมเลกุลขนาดใหญ่เกิดปฏิกิริยาดีโพลีเมอไรเซชัน(depolymerization) ขึ้นได้ ตัวอย่างเช่นพบว่าทำให้ความหนืดของสารละลายสตาร์ช (starch)กัมอะราบิก (gum arabic) เจลาติน (gelatin) และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ชนิดอื่นๆ มีค่าลดลง หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโพลีเมอร์ของสตาร์ชและเด็กซ์แตรน (dextrans) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดใหญ่โมเลกุลใหญ่ขึ้น รวมทั้งทำให้ DNA แตกสลายแต่ยังคงโครงสร้างขององค์ประกอบย่อยไว้ได้ เป็นต้น และในภายหลังยังค้นมีการพบว่าคลื่นอัลตราซาวด์นั้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป ซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของแก๊สที่ละลายหรือมีอยู่ในสารละลายที่นำมาสัมผัสกับคลื่น เช่นถ้าแทนที่แก๊สออกซิเจนด้วยไฮโดรเจน จะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่หลายชนิดเพิ่มขึ้นได้

ในส่วนของผลของคลื่นอัลตราซาวด์ต่อโปรตีน พบว่ามีความซับซ้อนในการเกิดปฏิกิริยาเมื่อสัมผัสกับคลื่นอัลตราซาวด์เช่นโพลีเมอร์ของโปรตีนทรงกลม (polymeric globular proteins) จะเกิดการแตกตัวทำให้มีขนาดเล็กลงเป็นหน่วยย่อย และถ้าในสารละลายตัวกลางนั้นมีแก๊สออกซิเจน อาจมีผลทำให้โครงสร้างจตุรภูมิ (quarternary structure) โดยอาจทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติได้ ในส่วนของไลโปโปรตีน (lipoprotein) คลื่นอัลตราซาวด์อาจทำให้ไขมันบางส่วนแยกออกจากโครงสร้าง (delipidation) และในฮีโมโปรตีน (haemoproteins) อาจทำให้เกิดการแยกตัวของฮีม(haeme) ออกจากโกลบิน (globin) และในกรณีที่สารละลายโปรตีนได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลานานมากขึ้น อาจมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยสายโซ่โพลีเปบไตด์อาจแตกออกทำให้เกิดชิ้นส่วนของโมเลกุลย่อยที่มีขนาดเล็กลง เป็นต้น เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์และจุลินทรีย์นั้นพบวฎ มีการนำเทคนิคหรือกระบวนการอื่นๆ มาใช้ร่วมกับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ซึ่งมีรายงานการศึกษาที่แตกต่างกันออกไป

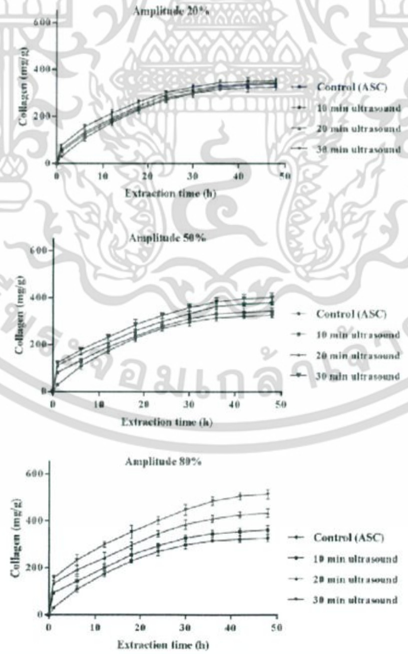
2.3.6 ผลของอัลตราซาวด์ต่อการสกัดคอลลาเจน

คลื่นอัลตราซาวด์จะช่วยทำให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในวัสดุที่นำมาสกัดได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนั้นคลื่นอัลตราซาวด์ยังไปทำลายพื้นผิว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่บริเวณผนังเซลล์และภายในเซลล์ทำให้สารที่ต้องการสกัดสามารถออกมาได้ง่ายขึ้น ตัวอย่าง เช่นการสกัดน้ำตาลออกจากหัวบีท (sugar beets) การสกัดโปรตีนจากสาหร่ายและจากถั่วเหลืองที่สกัดไขมัน การสกัดสารในชาออกจากใบชาในการผลิตชาสำเร็จรูปละลายได้ทันที เป็นต้น

จากการศึกษาของ Ali และคณะ (2018) ในการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดและเปปซินร่วมกับอัลตราซาวด์ในกระบวนการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลายี่สก *(Probarbus Jullieni)* ซึ่งใช้สารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ สกัดร่วมกับการใช้อัลตราซาวด์ที่พลังงาน 750 W ความถี่ 20 kHz จังหวะการเปิดสั่น 5 วินาที ปิด 5 วินาที ความกว้างของคลื่นอยู่ที่ 20, 50 และ 80 % และระยะเวลาการสกัดคือ 10, 20 และ 30 นาที ผลการทดลองพบว่า ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนที่ได้หลังการทำแห้งแบบระเหิด จะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาของการสกัดเพิ่มขึ้น และการสกัดด้วยอัลตราซาวด์ทำให้ได้ผลผลิตของคอลลาเจนมากกว่าการสกัดด้วยวิธีธรรมดา จะเห็นได้ว่าตัวอย่างควบคุมมีผลผลิตจากการสกัดที่ต่ำกว่าการใช้อัลตราซาวด์ และที่ความกว้างของคลื่นที่ใช้ในการสกัดเท่ากันแต่ระยะเวลาในการใช้อัลตราซาวด์นานขึ้น จะทำให้ผลผลิตมากขึ้นตามไปด้วย หรือหากดูเวลาในการใช้อัลตราซาวด์เท่ากันแต่ความกว้างของคลื่นไม่เท่ากัน ที่ความกว้างของคลื่นมากกว่าก็จะทำให้ได้ผลผลิตมากกว่าด้วยเช่นกัน ดังนั้นผลผลิตการสกัดคอลลาเจนขึ้นอยู่กับความกว้างของคลื่น และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ซึ่งจะทำให้ผลผลิตจากการสกัดคอลลาเจนที่ได้นั้นแตกต่างกัน และการสกัดที่ได้ผลผลิตมากที่สุดอยู่ที่การใช้อัลตราซาวด์ความกว้างคลื่น 80% เป็นเวลา 30 นาที และใช้เวลาในการสกัด 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 ผลผลิตคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด(ASC) และอัลตราซาวด์ที่สภาวะต่างๆจากหนังปลายี่สก

ที่มา: Ali และคณะ (2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ali และคณะ (2018) ได้ใช้เอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1% เติมลงในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับการใช้อัลตราซาวด์ที่พลังงาน 750 W ความถี่ 20 kHz จังหวะการเปิดสั่น 5 วินาที ปิด 5 วินาที ความกว้างของคลื่นอยู่ที่ 80 % และระยะเวลาการสกัดคือ 30 นาที ในการสกัดคอลลาเจนพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเปปซินก็จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดได้ดีขึ้น ซึ่งเปปซินความเข้มข้น 1% ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับเปปซินที่ความเข้มข้นต่ำกว่า เวลาในการสกัดก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ หากใช้เวลาในการสกัดที่เพียงพอจะทำให้ผลผลิตคอลลาเจนเพิ่มขึ้น ดังนั้นใช้อัลตราซาวด์ร่วมกับเปปซินในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้สกัดคอลลาเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพิ่มผลผลิต และลดเวลาในกระบวนการ ซึ่งการใช้อัลตราซาวนด์ที่ความกว้าง 80% เป็นเวลา 30 นาทีสกัดร่วมกับการใช้เปปซินที่ระดับ 1% จะทำให้ได้ผลผลิตสูงสุด

Kim และคณะ (2013) ได้รายงานผลการสกัดคอลลาเจนโดยการใช้อัลตราซาวด์จากหนังปลากะพง ว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้อัลตราซาวด์มีผลทำผลผลิตจากการสกัดคอลลาเจนได้มากกว่าการสกัดด้วยวิธีธรรมดา ซึ่งผลผลิตของการสกัดคอลลาเจนขึ้นอยู่กับความกว้างของช่วงคลื่นอัลตราซาวด์และ ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมและการสกัดแบบธรรมดา และเมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติก ความกว้างของคลื่น และระยะเวลาในการสกัดมากเท่าไหร่การสกัดคอลลาเจนก็ยิ่งได้มากขึ้นตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

หนังปลากราย จากตลาดท้องถิ่น (อ.บางเลน จ.นครปฐม)

3.1.2 สารเคมี

กรดอะซิติก (CH_3COOH)	Merck, Germany
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Ajax, Australia
บิวทิลแอลกอฮอล์	Merck, Germany
ทริส (Tris(hydroxymethyl) aminomethane)	Ajax, Australia
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Ajax, Australia
โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS)	Merck, Germany
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, America
คลอรามีนที (Chloramine T)	Ajax, Australia
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	Ajax, Australia
โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)	Ajax, Australia
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Germany
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	Ajax, Australia
โพแทสเซียมโซเดียมตราเตรท	Ajax, Australia
Folin-Ciocalteu reagent	Merck, Germany
Coomassie Blue R-250	Ajax, Australia
ไบยูเรต	Ajax, Australia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

บีกเกอร์	Duran, Germany
ขวดชมพู่	Duran, Germany
เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง	Mettler Toledo,Switzerland
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Mapada, China
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Memmert, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Thermo Scientific. Germany
Magnetic stirrer	IKA, Germany
ตู้อบไฟฟ้า (hot air oven)	Memmert, Thailand
Overhead stirrer	IKA, Germany
เครื่องชั่งละเอียด 5 ตำแหน่ง	Mettler Toledo,Switzerland
เครื่องวัดค่าความต่างความร้อนของสาร (DSC)	Mettler Toledo,Switzerland
เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)	Lynge, Denmark
เครื่องอัลตราซาวด์	Sonics, Model VC750, USA
หลอดเซนติฟิวส์พลาสติก (Centrifuge tube)	Fisher Scientific, England
กระบอกตวง (Cylinder)	Duran, Germany
ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)	Duran, Germany
ถ้วยอะลูมิเนียมขนาด 40 ไมโครลิตร	
ถ้วยอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น	
ปิเปต (Pipette)	
ไมโครปิเปต (Micropipette)	
ผ้าขาวบาง (Filter Cloth)	
อะลูมิเนียมฟรอยด์	
แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)	
ช้อนตักสาร (Spatula)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างหนังปลากราย

นำหนังปลากรายที่ได้จากตลาดท้องถิ่นใน อ.บางเลน จ.นครปฐมมาขอดเกล็ด ขูดเนื้อและก้างออกให้หมด ล้างด้วยน้ำเย็น และตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆขนาด 2 x 2 cm^2 แล้วนำไปใส่ถุงพลาสติกโพลีเอทธีลีน และแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ –18°C

3.3.2 การเตรียมคอลลาเจนจากหนังปลากราย

3.3.2.1 การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน และการกำจัดไขมัน

ขั้นตอนการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน และการกำจัดไขมันทั้งหมดอ้างอิงจากวิธีการของ Ali และคณะ (2018) ทุกขั้นตอนควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยแช่หนังปลาลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วนของหนังปลาต่อสารละลายที่ 1:15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 8 ชั่วโมงและกวนอย่างต่อเนื่อง (เปลี่ยนสารละลายด่างทุกๆ 2 ชั่วโมง) หลังจากแช่ด่างแล้วให้ล้างด้วยน้ำเย็น (4-5°ซ) เพื่อปรับค่า pH ให้เป็นกลาง ขจัดไขมันด้วย 10% butyl alcohol ในอัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลายคือ 1:15 เป็นเวลา16 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุก 8 ชั่วโมง) ล้างแอลกอฮอล์ออกด้วยน้ำเย็น

3.3.2.2 การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก (ASC)

ทำการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วนระหว่างหนังปลาต่อสารละลายคือ 1:15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร กวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นเพื่อกรองตะกอนออกจากกส่วนที่ใส (supernatant)

3.3.2.3 การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกร่วมกับการใช้อัลตราซาวด์ (UASC)

ทำการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ ที่มีอัตราส่วนระหว่างหนังปลาต่อสารละลายคือ 1:15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°ซ จากนั้นใช้อัลตราซาวด์ที่พลังงาน 750 W ความถี่ 20 kHz จังหวะการเปิดสั่น 5 วินาที ปิด 5 วินาที ความกว้างของคลื่นอยู่ที่ 20, 40, 60 และ 80 % ที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ หลังจากใช้อัลตราซาวด์สกัดต่อให้ครบ 48 ชั่วโมงโดยการกวนอย่างต่อเนื่อง และนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นเพื่อกรองตะกอนออกจากกส่วนที่ใส (supernatant)

3.3.2.4 การเก็บเกี่ยวคอลลาเจน

นำส่วนที่ใสมาทำให้ตกตะกอนโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายคือ 2.6 โมลาร์ เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมงเพื่อให้คอลลาเจนตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ จากนั้นนำส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในปริมาณน้อยที่สุด แล้วไดอะไลซ์ด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยด้วยน้ำกลั่นอีก 2 วัน และนำไปทำแห้งแบบระเหิด (freeze dry)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 ผลผลิตคิดเป็นปริมาณของแข็งทั้งหมด

ผลผลิตคอลลาเจนคำนวณจากน้ำหนักเริ่มต้น (น้ำหนักแห้ง) ของวัตถุดิบจากสมการ

$$\text{ผลผลิตคิดเป็นปริมาณของแข็งทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนแห้ง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

3.3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างหนังปลากรายสด (จากข้อ 3.1) และคอลลาเจน (จากข้อ 3.3.2.4) ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) ตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963)

3.3.5 การจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจน

3.3.5.1 ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน

ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยชั่งตัวอย่าง 3 ก. ผสมกับ 5% SDS จำนวน 27 มล. นำมาปั่นผสม (Homogenise) เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่ 85°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 x g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอน แล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวที่ลอยอยู่เหนือตะกอน (Supernatant) มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีไบยูเรตให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และนำส่วนที่เป็นของเหลว (Supernatant) มาผสมกับ SDS-Page sample buffer ในสัดส่วนเท่ากับ 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และต้มเป็นเวลา 3 นาที และนำตัวอย่างมา 15 มิลลิกรัมโปรตีน โหลดใส่เจลที่ทำจาก 4 % stacking และ 7.5% running gel จากนั้นป้อนกระแสที่มีค่าความต่างศักย์ที่สม่ำเสมอ 15 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล เข้าสู่อิเลคโตรโฟรีซิส จากนั้นย้อมเจลด้วย 0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250 ในเอทธานอลความเข้มข้น 15% และกรดอะซิติกความเข้มข้น 5% แล้วล้างสีออกด้วยเมทธานอลความเข้มข้น 30% และกรดอะซิติกความเข้มข้น 10%

3.3.5.2 ความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน

นำตัวอย่างคอลลาเจนตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นชั่งน้ำหนักในอะลูมิเนียมแพนและหยดน้ำปริมาตรเท่ากับน้ำหนักตัวอย่าง จะได้น้ำหนักตัวอย่างสุดท้ายประมาณ 15-18 มิลลิกรัม ปิดผนึก จากนั้นตรวจสอบความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจนโดยใช้ Different scanning colorimeter (model DSC 7, Norwalk, CT, USA) โดยควบคุมตัวอย่างที่อุณหภูมิ 20°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแสกนตัวอย่างที่อัตรา 10°ซ ต่อนาที ที่ช่วง 20-150°ซ ประมาณค่าเอลทัลปี (ΔH) และค่าอุณหภูมิสูงสุด (T_{max}) จากเทอร์โมแกรม

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

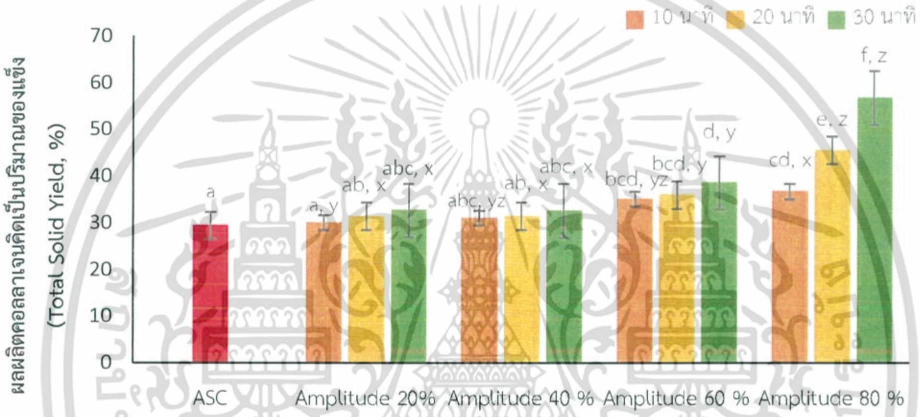
วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละสิ่งทดลองทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Duncan’s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Steel และ Torrie, 1980) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลผลิตคอลลาเจนคิดเป็นปริมาณของแข็ง

จากการทดลองใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย โดยทำการศึกษาผลของการใช้อัลตราซาวด์ที่ความกว้างคลื่น 20, 40, 60 และ 80% ที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที ต่อปริมาณผลผลิตเป็นของแข็งทั้งหมดดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ผลผลิตคอลลาเจนคิดเป็นปริมาณของแข็งที่สกัดได้จากหนังปลากราย (*Chitala ornata*) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ

ASC: คอลลาเจนที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด

*a,b,c,..,f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

*x,y,z แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างการใช้ความกว้างของคลื่นอัลตราซาวด์ (Amplitude) ต่างกัน ที่ระยะเวลาเดียวกัน

จากการใช้กระบวนการสกัดที่ไม่มีอัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด (ASC) ให้ผลผลิตที่ 29.45% ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนจากหนังปลากรายเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตคอลลาเจนที่ได้จากกระบวนการที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงความกว้างคลื่น 60% และ 80% ในทุกๆระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์ช่วย ($p<0.05$) นอกจากนี้การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่ความกว้างคลื่น 80% เป็นเวลา 30 นาที ให้ค่าผลผลิตสูงที่สุด (56.79%) ($p<0.05$) แต่ยังให้ผลผลิตน้อยกว่าคอลาเจนจากหนังปลาชนิดอื่น เช่น หนังปลายี่สก (81.53%) (Ali และคณะ, 2018) และหนังปลากะพง (66.82%) (Kim และคณะ,

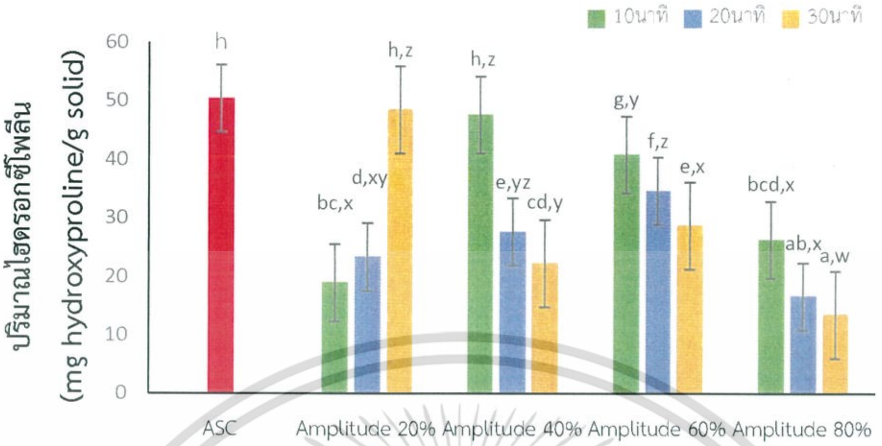
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2013) ที่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตคอลลาเจนจากการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่ระยะเวลาเดียวกัน พบว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความกว้างคลื่นสูงกว่า จะให้ผลผลิตที่สูงกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความกว้างคลื่นมากกว่า 40% ($p<0.05$) ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปตามการทดลองของ Ali และคณะ (2018) ที่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลายี่สก *(Probarbus Jullieni)* กลไกของการอัลตราซาวด์ในระบบของเหลวส่วนใหญ่เกิดจากการปล่อยคลื่นเสียงก่อให้เกิดแรงดันสูงและต่ำ ทำให้เกิดการสั่นสะเทือน ส่งผลให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในวัสดุที่นำมาสกัดได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนั้นคลื่นอัลตราซาวด์ยังไปทำลายพื้นผิวที่บริเวณผนังเซลล์และภายในเซลล์ทำให้สารที่ต้องการสกัดสามารถออกมาได้ง่ายขึ้น ดังนั้นการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากรายส่งผลให้ปริมาณผลผลิตที่คิดเป็นปริมาณของแข็งนั้นเพิ่มขึ้นเมื่อความกว้างคลื่นอัลตราซาวด์และระยะเวลาการสกัดเพิ่มขึ้น

4.2 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

จากการทดลองใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย โดยทำการศึกษาผลของการใช้อัลตราซาวด์ที่ความกว้างคลื่น 20, 40, 60 และ 80% ที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที ต่อปริมาณไฮดรอกซีโพลีน (ภาพที่ 4.2) โดยคอลลาเจนที่ได้จากกระบวนการสกัดที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด (ASC) มีปริมาณไฮดรอกซีโพลีนอยู่ที่ 50.38 mg/g ของแข็ง การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากรายมีผลต่อการลดลงของปริมาณไฮดรอกซีโพลีน ปริมาณไฮดรอกซีโพลีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อระยะเวลาที่ใช้อัลตราซาวด์เพิ่มขึ้นในทุกๆความกว้างคลื่นอัลตราซาวด์ที่ทดสอบ ยกเว้นที่ความกว้างคลื่น 20% จากผลการทดลองอาจชี้ให้เห็นว่าการใช้ความกว้างคลื่นอัลตราซาวด์ที่ต่ำ (20%) ต้องใช้ระยะเวลาที่นาน ที่จะทำให้คลื่นเสียงแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างหนัง และช่วยในการสกัดคอลลาเจนได้ดีขึ้น ในขณะที่การใช้สภาวะอัลตราซาวด์ที่รุนแรงขึ้นด้วยคลื่นเสียงที่มีความกว้างคลื่นสูงขึ้น (40-80%) แค่เพียงระยะเวลาที่สั้นการสั่นสะเทือนนั้นก็สามารถทำให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในหนังปลากรายได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นและสามารถสกัดคอลลาเจนได้มากขึ้น และเมื่อให้ระยะเวลาในการใช้อัลตราซาวด์ในกระบวนการสกัดมากขึ้น องค์ประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่คอลลาเจนก็สามารถหลุดออกมาด้วยจึงทำให้ความบริสุทธิ์ (purity) ของคอลลาเจนที่ได้นั้นลดลง ในอุตสาหกรรมอัลตราซาวด์จึงถูกนำมาใช้เพื่อสกัดสารประกอบโพลีฟีนอล, น้ำมัน, แคโรทีนอยด์คลอโรฟิลล์และกรดอินทรีย์บางชนิดจากแหล่งต่างๆ (Ali และคณะ, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ปริมาณไฮดรอกซีโพลีนที่สกัดได้จากหนังปลากราย (*Chitala ornata*) โดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดที่สภาวะต่างๆ

ASC: คอลลาเจนที่ไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด

*a,b,c,..,h แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

*w,x,y,z แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างการใช้ความกว้างของคลื่นอัลตราซาวด์ (Amplitude) ต่างกัน ที่ระยะเวลาเดียวกัน

4.3 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน

รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัด แสดงในภาพที่ 4.3 พบว่ารูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังปลากราย (ASC) ประกอบด้วยสาย α 2 สาย (α1 และ α2) และยังพบการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุล และภายในโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบของ β (โครงสร้างสองสาย) และ γ (โครงสร้างสามสาย) (Zeng และคณะ, 2012) เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งสอดคล้องกับคอลลาเจนจากปลาสายพันธุ์อื่น เช่นปลาสวาย (Singh และคณะ, 2011) ปลากระพงแม่น้ำไนล์ (Muyonga และคณะ, 2004) ปลายี่สก (Ali และคณะ, 2018) ซึ่งตรงกับคุณลักษณะของคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นคอลลาเจนหลักที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Muyonga และคณะ, 2004) ในขณะเดียวกัน การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดส่งผลให้เกิดโปรตีนสายสั้นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า(α_2) 115 kDa เพิ่มขึ้น การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้นทำให้เกิดเปปไทด์สายสั้นเพิ่มมากขึ้น (Kim และคณะ, 2013) ในทุกความกว้างคลื่นที่ทำการศึกษา โดยสังเกตุได้จากความเข้มของแถบโปรตีนมวลโมเลกุลต่ำ (42-100 kDa) ที่เพิ่มขึ้น จากปรากฏการณ์แคปวิเตชัน (Cavitation) ซึ่งเกิดขึ้นในสารละลาย (0.5 M CH_3COOH) ที่ได้รับคลื่นเสียงอัลตรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซาวด์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพ เนื่องมาจากฟองอากาศ (bubbles) ที่เกิดขึ้นภายในของเหลวสัมผัสกับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตราซาวด์เกิดการแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างกัน (Atchley and Crum, 1998) ทำให้ฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้นไปเรื่อยๆ จนกระทั่งแตกออก การแตกออกของฟองอากาศจะไปทำลายโครงสร้างของคอลลาเจน (Triple helix) ซึ่งเมื่อความกว้างคลื่นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นการสั่นสะเทือนก็มากขึ้นจึงทำให้โครงสร้าง γ, β, α_1 และ α_2 ที่เป็นองค์ประกอบหลักของคอลลาเจนเกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นลง ดังนั้นการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดจึงมีผลต่อรูปแบบโปรตีนคอลลาเจน ซึ่งความกว้างคลื่นและระยะเวลาที่มีผลต่อรูปแบบโปรตีนคอลลาเจน แต่อย่างไรก็ตามสภาวะของอัลตราซาวด์ที่ใช้เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดคอลลาเจนในการทดลองนี้ ยังคงเป็นรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน type I ไว้ได้เช่นเดียวกับ ASC

ภาพที่ 4.3 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังปลากราย (*Chitala ornata*) ที่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดในสภาวะต่างๆ

M; โปรตีนมาตรฐาน, ASC; คอลลาเจนจากหนังปลากรายที่ไม่ได้ใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยในการสกัด, 20%, 40% และ 60%; คอลลาเจนจากหนังปลากรายที่ใช้อัลตราซาวด์ความกว้างคลื่น 20%, 40% และ 60%ช่วยในกระบวนการสกัดที่ระยะเวลา 10 20 และ30 นาที

4.4 ความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน

จากการวิเคราะห์ความคงตัวต่อความร้อนด้วยวิธี Differential Scanning Calorimetry (DSC) พบว่าคอลลาเจนจากหนังปลากราย ที่สกัดโดยไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัด (ASC) มีค่าอุณหภูมิสูงสุดก่อนการเสียสภาพธรรมชาติ (T_{max}) และการเปลี่ยนแปลงของเอนทัลปี (ΔH) เท่ากับ 113.1 ^{o}ซ และ 1833.61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ซึ่ง T_{max} ที่ได้นั้นมีค่าน้อยกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากตะพาบน้ำ (120.66^{o}ซ) (Ye และคณะ, 2016) และการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดคอลลาเจนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นระเบียบในการจัดเรียงโครงสร้างของคอลลาเจน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ Triple helix ภายในคอลลาเจน ทำให้ค่าอุณหภูมิสูงสุดก่อนการเสียสภาพธรรมชาติ (T_{max}) และการเปลี่ยนแปลงของเอนทัลปี (ΔH) ของคอลลาเจนที่ได้จากการใช้อัลตราซาวด์ที่สภาวะต่างๆ แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 4.1 จะเห็นได้ว่าเมื่อความกว้างคลื่นอัลตราซาวน์ที่ใช้สกัดเพิ่มมากขึ้น T_{max} จะลดลงเนื่องจากอาจเป็นผลกระทบจากปรากฏการณ์แคปวิเตชัน (Cavitation) ส่งผลให้โครงสร้างของคอลลาเจนถูกทำให้เสียสภาพเกิดเป็นโปรตีนสายสั้น (Ali และคณะ, 2018) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรูปแบบโปรตีนคอลลาเจนคือ เมื่อความกว้างคลื่นที่ใช้สกัดคอลลาเจนจากหนังปลากรายเพิ่มขึ้น คอลลาเจนจะเสียสภาพทำให้มีโปรตีนสายสั้นเพิ่มมากขึ้น T_{max} ที่ได้จึงลดลงเพราะโครงสร้างบางส่วนของคอลลาเจนถูกทำลาย

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของเอนทัลปี (ΔH) และอุณหภูมิสูงสุดก่อนการเสียสภาพธรรมชาติ (T_{max}) ของคอลลาเจนจากหนังปลากรายที่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในกระบวนการสกัดในสภาวะต่างๆ

ตัวอย่าง		ΔH (J/g)	T_{max} (^{o}ซ)
Control (ASC)		1833.61 ± 57.96^{ef}	113.1 ± 4.50^{cd}
Amplitude 20%	10 นาที	1693.12 ± 144.55^{de}	117.2 ± 4.89^{de}
	20 นาที	1132.91 ± 101.54^{c}	119.79 ± 0.44^{de}
	30 นาที	1631.27 ± 102.82^{d}	105.59 ± 5.72^{abc}
Amplitude 40%	10 นาที	1010.8 ± 102.61^{bc}	128.44 ± 0.42^{f}
	20 นาที	1791.75 ± 112.98^{ef}	113.54 ± 1.14^{cd}
	30 นาที	1845.96 ± 56.07^{ef}	124.56 ± 2.80^{ef}
Amplitude 60%	10 นาที	939.34 ± 43.19^{b}	97.14 ± 1.01^{a}
	20 นาที	584.57 ± 11.27^{a}	130.6±1.26f
	30 นาที	1585.46 ± 149.62^{d}	100.15 ± 1.96^{ab}
Amplitude 80%	10 นาที	2022.04 ± 41.75^{g}	108.16 ± 5.56^{bc}
	20 นาที	1863.45 ± 8.41^{f}	103.35 ± 4.88^{ab}
	30 นาที	1626.39 ± 11.11^{d}	103.89 ± 4.26^{ab}

* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

อัลตราซาวด์สามารถใช้เป็นกระบวนการช่วยในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย (*Chitala ornata*) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ความกว้างคลื่นอัลตราซาวด์ และ ระยะเวลามีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของคอลลาเจนที่ได้ เมื่อความกว้างคลื่นและระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นส่งผลให้ผลผลิตคอลลาเจนเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณไฮดรอกซีโพลีนลดลง เนื่องจากการใช้อัลตราซาวด์ที่ความกว้างคลื่นและระยะเวลาในการสกัดที่เพิ่มขึ้นทำให้องค์ประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่คอลลาเจนหลุดออกมาด้วย เมื่อใช้อัลตราซาวด์สภาวะที่รุนแรงขึ้นโครงสร้างคอลลาเจนจะถูกทำลายเกิดเป็นเปปไทด์สายสั้น และค่าความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจนแสดงให้เห็นการคงอยู่ของโครงสร้างที่เป็นระเบียบจากการใช้อัลตราซาวด์ที่สภาวะต่างๆ ดังนั้นอัลตราซาวด์สามารถใช้ช่วยในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย โดยการเลือกสภาวะและการประยุกต์ใช้ที่เหมาะสมมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพื่อให้ได้คอลลาเจนที่มีผลผลิต และคุณภาพที่ดี

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ขั้นตอนการสกัดโดยใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วยยังใช้เวลาสกัด 48 ชั่วโมงเท่ากับ ASC หากมีการทดลองครั้งต่อไปอาจลดเวลาในการสกัดของวิธีที่ใช้อัลตราซาวด์เป็นกระบวนการช่วย และนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกัน

2. ในขั้นตอนการ dialyse หลังการสกัดควรใช้เวลาในมากกว่า 2 วัน หรือทำการเปลี่ยนน้ำให้บ่อยขึ้นเพื่อให้ dialyse คอลลาเจนได้อย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

นนณ์ ผานิตยวงศ์. 2554. ปลากราย *Chitala ornate*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.mornorfishclub.com/forum.php?mod=viewthread&tid=3004. 3 พฤศจิกายน 2561.

นันทพร อัคนิจ. 2550. การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มาลัยวรรณ อารยะสกุล และ วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร. 2549. เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 5. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิทธิกร จำเริญลาภกุล. 2528. อุลตร้าโซนิก. วิทยาศาสตร์การอาหาร 16(2) : 1-6.

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

Atchley, A. A. and L. A. Crum. 1998. Acoustic cavitation and bubbles dynamics. pp. 1- 64. In " Ultrasounds, its chemical, physical and biological effects". K. S. Suslick (ed.). VCH Publishers, Inc. New York.

Ali, M.M., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2018. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp *(Probarbus Jullieni)* as affected by ultrasonication. Process Biochemistry. DOI: https://doi.org/10.1016/ j. procbio.2018. 01. 003.

Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A. and Hara, K. 2008. Biochemical properties of acid-solubilized collagens extracted from the skins of under-utilised fishes. Food Chemistry. 108: 49-54.

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

Bhattacharjee, A. and Bansal, M. 2005. Collagen structure: The Madras triple helix and the current scenario. IUBMB Life. 57: 161-172.

Burgos, J., J. A. Ordonez and F. J. Sala. 1972. Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of Bacillus cereus and Bacillus licheniformis spores. Appl. Microbiol. 24 : 497 – 498.

Friess, W. 1998. Collagen biomaterial for drug delivery. European Journal Pharmaceutical and Biopharmaceutics. 45: 113-136.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Frizzell, L. A. 1988. Biological effects of acoustic cavitation. pp. 287- 303. In "Ultrasounds, its chemical, physical and biological effects". K. S. Suslick (ed.). VCH Publishers, Inc. New York.

Huang, Y.R. Shiau, C.Y. Chen, H.H. and Huang, B.C. 2011. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish *(Diodon holocanthus)*. Food Hydrocolloids. 25: 1507-1513.

Kim, H., Kim, Y., Park, H. and Lee, N. 2013. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*. The Japanese Society of Fisheries Science 2013. 78:849-856.

Kimura, S. and Ohno, Y. 1987. Fish type I collagen: tissue-specific existence of two molecular forms, $\alpha1$ $\alpha2$ $\alpha3$, in Alaska pollack. Comparative Biochemistry and Physiology, part B. 88: 409-413.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Shahidi, F. 2010. Isolation and characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). Food Chemistry. 119: 1519–1526.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Liu, H.Y. Li, D. and Guo, S.D. 2007. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctaus*). Food Chemistry. 101: 621-625.

Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 256-275.

Mason, T. J. , Paniwnyk, L. , and Lorimer, J. P. 1996. The uses of ultrasound in food technology. Ultrasonics Sonochemistry 3 : 253-260.

McClements, D. J. 1997. Ultrasonic characterization of foods and drinks : principles,methods and application. Crit. Rev. Food Sci. & Technol. 37(1) : 1-46.

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

Olsen, D., Yang, C., Bodo, M., Chang, R., Leigh, S., Baez, J., Carmichael, D., Perala, M., Hamalainen, E., Jarvinen, M. and Polarek, J. 2003. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. advanced drug delivery reviews. 55: 1547-1567.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Povey, M. J. W. 1989. Ultrasonics in Food Engineering. Part II : Applications. J. Food Eng. 9 : 1 – 20.

Sala, F. J., J. Burgos, S. Condon, P. Lopez and J. Raso. 1995. Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. pp. 176-204. In " New methods of food preservation". G. W. Gould (ed.). Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Veeruraj, A., Arumugam, M. and Balasubramanian, T. 2013. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*) Journal of Process Biochemistry. 48: 1592–1602.

William, A. 1994. New technologies in food preservation and processing : part II. Nutr. & Food Sci. 1 : 20 – 23.

Yata, M., Yoshida, C., Fujisawa, S., Mizuta, S. and Yoshinaka, R. 2001. Identification and characterization of molecular species of collagen in fish skin. Journal of Food Science. 66. 247-251.

Ye, Z., Li, W., Panpan, C., Pengpeng, L., Muhan, Z., Zhilan, S., Chong, S., Weimin, X. and Daoying, W. 2017. Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. International Journal of Biological Macromolecules. 105: 1602–1610.

Zeng, S., Yin, J., Yang, S., Zhang, C., Yang, P. and Wu, W. 2012. Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). Food Chemistry. 135: 1975–84.

Zhang, M., Liu, W. and Li, G. (2009). Isolation and characterization of collagens from the skin of largenfin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). Food Chemistry. 115. 826-831.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate Analysis)

ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยอบในตู้ไฟฟ้า (AOAC, 1999)

1. อุปกรณ์

1.1 ตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 105องศาเซลเซียส

1.2 ถ้วยอะลูมิเนียม

1.3 โถดูดความชื้น

1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า

2. วิธีการ

2.1 อบภาชนะสำหรับหาความชื้น (ถ้วยอะลูมิเนียม) ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.2 นำถ้วยอะลูมิเนียมออกจากตู้อบลมร้อนใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้ จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง

2.3 ชั่งน้ำหนัก และจดบันทึก

2.4 กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.5 ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว

2.6 นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในตู้ดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น

2.7 นำถ้วยอะลูมิเนียมเข้าตู้อบ และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.8 จดบันทึก

3. การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน ตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963)

1.สารเคมี

1.1 สารละลายออกซิแดนซ์ : เตรียมโดยผสม chloromine T ร้อยละ 7 กับสารละลาย acetate/phosphate buffer ที่มี pH 6.0 ในอัตราส่วน 1: 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

1.2 สารละลาย ehrlich’s reagent ที่มีส่วนผสมของ

- สาร p-dimethylamino-benzaldehyde ที่ละลายในกรด perchloric ร้อยละ 60 เตรียมโดยละลาย p-dimethylamino-benzaldehyde จำนวน 3 กรัม ในกรด perchloric ปริมาณ 3 มิลลิลิตร
- Isopropanol

ผสม p-dimethylamino-benzaldehyde กับสารละลาย isopropanol ในอัตราส่วน 3: 13 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2.การเตรียมตัวอย่าง

2.1 ชั่งตัวอย่าง 0.5-1 กรัม ใส่หลอดทดลองแบบฝาเกลียว เติมไฮโดรเจนคลอไรด์ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียว

2.2 นำไปไฮโดรไลซ์ ที่ 130°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน oil bath จนได้สารละลายใส ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Activated carbon (ตักปลายช้อน) และทำการ vortex

2.3 กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ใน Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และล้างด้วยน้ำกลั่น

2.4 ทำให้เป็นกลางด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ จนได้ pH ประมาณ 6.0-6.8 และปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. การวิเคราะห์

3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแบบฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร

3.2 ปิเปต Iso–propanol 0.2 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน

3.3 ปิเปตสารละลายออกซิแดนซ์ 0.1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 4 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.4 ปิเปตสารละลาย Ehrlich’s reagent 1.3 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ใน Water bath

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ทำให้เย็นโดยเปิดน้ำไหลผ่าน 2-3 นาที ทำให้เจือจางด้วย Iso-propanol 3.3 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 558 นอร์มอล ภายใน 24 ชั่วโมง

ตารางภาคผนวก ข 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีน

หลอดทดลองที่	น้ำ (ไมโครลิตร)	ไฮดรอกซีโพรลีน 400 ppm (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของไฮดรอกซีโพรลีน (ppm)
1	100	0	0
2	97.5	2.5	10
3	95.0	5.0	20
4	92.5	7.5	30
5	90.0	10.0	40
6	87.5	12.5	50
7	85.0	15.0	60

การคำนวณ

ใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีน

เช่น Y = 0.0125x, R^2 = 0.9982

ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสง/0.0125

= x มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายตัวอย่างปริมาณ 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน x มิลลิกรัมต่อลิตร

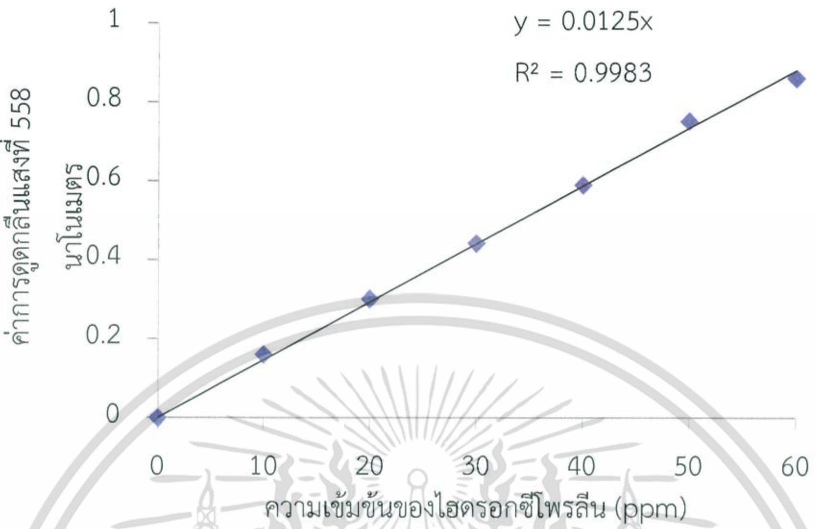
ถ้าสารละลายตัวอย่างปริมาณ 100 มิลลิลิตร มีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน $\frac{x}{10}$ มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายจำนวน 100 มิลลิลิตร มาจากตัวอย่างจำนวน A กรัม

∴ ตัวอย่างมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน $\frac{x}{10A}$ มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง

โดยมีปริมาณคอลลาเจนเท่ากับ $\frac{x}{10A}$ X 7.25 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวก ข 1 กราฟมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังปลากรายตามวิธี ของ Laemli (1970)

1.สารเคมี

1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ (electrode buffer) ที่มีส่วนผสมของ

- Tris ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ จำนวน 3.0285 กรัม
- SDS ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จำนวน 1 กรัม
- Glycine ความเข้มข้น 192 มิลลิโมลาร์ จำนวน 14.4134 กรัม
  แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

1.2 Fixing solution ที่มีส่วนผสมของ

- Methanol ปริมาณ 500 มิลลิลิตร
- กรด Acetic ปริมาณ 100 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น ปริมาณ 400 มิลลิลิตร
  แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

1.3 Staining solution

- Coomassie brilliant blue R250 จำนวน 0.5 กรัม
- Methanol ปริมาณ 150 มิลลิลิตร
- กรด Acetic ปริมาณ 50 มิลลิลิตร
  แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

1.4 Sample buffer (SDS non-reducing buffer)

- Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร
- SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาณ 4 มิลลิลิตร
- กลีเซอรอล ปริมาณ 2 มิลลิลิตร
- โบรโมฟีนอลบลู จำนวน 0.03 กรัม
  แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร

1.5 สารที่ใช้ในการเตรียมเจล

- Acrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 30
- Tris ความเข้มข้น 1.5 M pH 8.8
- Tris ความเข้มข้น 0.5 M pH 6.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- น้ำ DI
- SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10
- APS ความเข้มข้นร้อยละ 10
- TEMED

2. อุปกรณ์

2.1 Slab gel electrophoresis apparatus

2.2 Power supply

3. การเตรียมตัวอย่าง

3.1 ละลายตัวอย่างด้วย 5% SDS ต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.2 นำตัวอย่างไป Centrifuge ที่ 10,000 RPM นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารละลายส่วนใส

3.3 วัดปริมาณโปรตีนที่ละลายใน SDS ด้วยวิธีไบยูเรต

3.4 นำตัวอย่างผสมกับ Sample buffer ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 3.00% แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 3 นาที

4. การเตรียม Acrylamide gel

4.1 ปิเปตสารเคมีผสมกันดังตาราง

4.2 หยอด Running gel ระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้เซ็ตเจล ให้ระดับสารละลายห่างจากขอบบนของกระจกประมาณ 1.75 ซม. ทิ้งให้เกิด Polymerization ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนเจลแข็งตัว

4.3 หยด Stacking gel จนถึงขอบกระจก แล้วเสียบหวี ให้เกิดช่องสำหรับโหลดตัวอย่าง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 45 นาที จนเจลแข็งตัว

5. การรันตัวอย่าง

5.1 เตรียมและติดตั้งแผ่นกระจกที่บรรจุเจลเข้ากับกล่อง เติม Electrode buffer ให้ท่วมแผ่นเจล

5.2 ดูดตัวอย่างปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ด้วย Micro pipette แล้วหยอดลงใน Well ของแผ่นเจล

5.3 ทำเช่นเดียวกันกับ Protein standard marker

5.4 ต่อกล่องติดตั้งเจลเข้ากับ Power supply เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 20 mA/gel ประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีน้ำเงินของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนลงไปที่ขอบล่างของเจลและปิดกระแสไฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.การย้อมและการล้างแผ่นเจล

6.1 นำแผ่นเจลออกจากกระจกอย่างระมัดระวัง แล้วแช่แผ่นเจลลงใน fixing solution แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า 30 นาที

6.2 เท Fixing solution ออกแล้วย้อมสีโดยใส่ Staining solution วางบนเครื่องเขย่าแล้วทิ้งไว้ข้ามคืน

6.3 เท Staining solution ออกแล้วเติม Destaing solution จนท่วมแผ่นเจล แช่นานประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าพื้นหลังของเจลใส

ตารางภาคผนวก ค 1 การเตรียมเจล

Reagents	Running gel ร้อยละ7.5	Stacking gel ร้อยละ 4
Acrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 30	3.75 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร
Tris ความเข้มข้น 1.5 M pH 8.8	3.75 มิลลิลิตร	-
Tris ความเข้มข้น 0.5 M pH 6.8	-	1.875 มิลลิลิตร
น้ำ DI	7.27 มิลลิลิตร	4.50 มิลลิลิตร
SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10	150 ไมโครลิตร	75 ไมโครลิตร
APS ความเข้มข้นร้อยละ 10	7.5 ไมโครลิตร	37.5 ไมโครลิตร
TEMED	7.5 ไมโครลิตร	4.5 ไมโครลิตร
ทั้งหมด	15 มิลลิลิตร	7.5 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

1. เตรียม Running gel ร้อยละ 7.5 และ Stacking gel ร้อยละ 4 จากนั้นเติม running gel ร้อยละ 7.5 ลงใน slab gel electrophoresis apparatus ก่อนแล้วเติม stacking gel ร้อยละ 4ลงไป
2. เติมสารละลายคอลลาเจนและโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน
3. เติม electrode buffer ลงใน chamber
4. เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 20 mA/gel ประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีน้ำเงินของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนลงไปที่ขอบล่างของเจล
5. ปิดกระแสไฟ และนำแผ่นเจลแช่ใน fixing solution แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า 10นาที
6. เท fixing solution ออกแล้วย้อมสีโดยใส่ staining solution วางบนเครื่องเขย่าแล้วทิ้งไว้ข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการละลายของคอลลาเจน

สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์
2. กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

การเตรียมตัวอย่าง

1. นำคอลลาเจนไปละลายในกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ จนความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. กวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนทำปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์

การวิเคราะห์

1. นำคอลลาเจนปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ในกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นต่างกัน (0ร้อยละ, 2ร้อยละ, 4ร้อยละ, 6ร้อยละ, 10ร้อยละ และ 12ร้อยละ)
2. กวนอย่างต่อเนื่องที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. ปั่นเหวี่ยงที่ 10000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. นำส่วนที่ใสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ BSA เป็นสารมาตรฐาน ดูความสัมพันธ์ของการละลายโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีการละลายสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล ปิณฑิรา อนันตลาภ
วัน เดือน ปีเกิด 30 สิงหาคม 2539
ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ.2562 วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ-นามสกุล พีรยา ศรีสวัสดิ์
วัน เดือน ปีเกิด 9 ธันวาคม 2539
ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ.2562 วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้