

การจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด
จากหนังปลาไบโพจุด

Characterization of acid soluble collagen isolated from
Spotted sicklefish (*Drepane punctata*) skin



ญาณวุฒิ เมี้ยำเน็ด
สาวฟ้า เฉลยสมัย
สุภาภรณ์ เมฆนามนิตย์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาอุตสาหกรรมอาหาร

คณะอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาใบโพจุด
Characterization of acid soluble collagen isolated from
Spotted sicklefish (*Drepane punctata*) skin

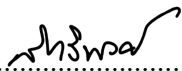
จัดทำโดย

ญาณวุฒิ เมัยก่าเนิด รหัสนักศึกษา 62080016

สาวฟ้า เฉลยสมัย รหัสนักศึกษา 62080057

สุภาภรณ์ เมฆนามนิตย์ รหัสนักศึกษา 62080068

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....


.....20 /พ.ศ..... / 2566.

(ผศ.ดร.สิทธิพงศ์ นลินานนท์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลา ใบโพจุด	
ชื่อนักศึกษา	ญาณวุฒิ เมี้ยก่านิด	รหัสนักศึกษา 62080016
	สาวฟ้า เฉลยสมัย	รหัสนักศึกษา 62080057
	สุภาภรณ์ เมฆนามนิตย์	รหัสนักศึกษา 62080068
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร	
พ.ศ.	2566	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สิทธิพงศ์ นลินานนท์	

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมและการจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาใบโพจุด โดยคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุดที่เตรียมได้มีปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 25.44% (ร้อยละโดยน้ำหนักฐานแห้ง) โดยมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนเท่ากับ 91.60 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบรูปแบบโปรตีนพบว่า ASC ประกอบด้วยสายโซ่ α 2 สาย ($\alpha 1$ และ $\alpha 2$) สาย β และสาย γ เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีสาย $\alpha 1$ เป็นปริมาณ 2 เท่าของสาย $\alpha 2$ สามารถจำแนก ASC ได้เป็นคอลลาเจน type I เมื่อตรวจสอบโครงสร้างระดับทุติยภูมิของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) พบว่า ASC มีรูปแบบการเกิดพืดในช่วงเลขคลื่นใกล้เคียงกับคอลลาเจน type I และพบโครงสร้างสามสายพันเกลียวกัน (triple helical structure) ASC สามารถละลายได้ดีที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำกว่าร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และการละลายลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น ASC สามารถละลายได้ดีในสารละลายที่เป็นกรด (pH 1-4) แต่ความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: ปลาใบโพจุด, การจำแนกคุณลักษณะ, คอลลาเจน, ปลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Characterization of acid soluble collagen isolated from Spotted sicklefish (<i>Drepane punctata</i>) skin	
Student name	Yannawut Meuykamnerd	Student ID 62080016
	Saofa Chaloeisamai	Student ID 62080057
	Supaporn Maknamnit	Student ID 62080068
Program	Bachelor of Science in Food Science and Technology	
Year	2023	
Advisor	Assist.Prof.Dr. Sitthipong Nalinanon	

ABSTRACT

The objective of this research was to prepare and characterize acid soluble collagen (ASC) from the skin of spotted sicklefish (*Drepane punctata*). The yield of the resultant ASC from spotted sicklefish skin was 25.44% (on a dry weight basis). ASC had a hydroxyproline content of 91.60 ± 0.26 mg/g sample. Protein patterns revealed that ASC consisted of two α chains (α_1 and α_2), β and γ chains as the major components. ASC had α_1 and α_2 intensity ratio of approximately 2 : 1 and was characterized as type I collagen. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy revealed that ASC showed an FTIR spectrum, consisting of major peaks, similar to collagen type I, representing the existence of a triple helical structure. ASC was soluble at concentrations of NaCl below 2% (w/v), and its solubility decreased markedly at higher NaCl concentrations. ASC could dissolve well in acidic solutions (pH 1-4), but its solubility decreased with increasing pH.

Keywords: Spotted sicklefish, Characterization, Collagen, Fish.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาปัญหาพิเศษเรื่อง การจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาไบโพจูด ครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.สิทธิพงศ์ นลินานนท์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษในครั้งนี้ ที่เสียสละเวลา เพื่อให้ความช่วยเหลือ และให้ข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนคำแนะนำที่ดีที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ตั้งแต่เริ่มทำปัญหาพิเศษจนถึงการนำเสนอ จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณความช่วยเหลือของรุ่นพี่ในห้องปฏิบัติการ ที่คอยเอาใจใส่ แนะนำ และเสียสละเวลาทำให้การดำเนินการต่าง ๆ ขณะทำวิจัยสำเร็จลุล่วงมาได้ รวมทั้งขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของคณะอุตสาหกรรมอาหารทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำปฏิบัติการงานวิจัย

สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัว และเพื่อน ๆ ที่คอยดูแล ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ คณะผู้วิจัยเสมอมาตลอดจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง คณะผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับ ผู้ที่สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้วิจัยขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ญาณวุฒิ เมัยกำเนิด

สาวฟ้า เฉลยสมัย

สุภาภรณ์ เมฆนามนิตย์

1 พฤษภาคม 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญภาพ	VI
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ปลาใบโพจุด	3
2.2 คอลลาเจน	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	26
3.1 วัสดุดิบและสารเคมี	26
3.2 อุปกรณ์	27
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	32
4.1 ปริมาณร้อยละของผลผลิตคอลลาเจน	32
4.2 การจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจน	33
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน	46
ภาคผนวก ข การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน	49
ภาคผนวก ค วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	52
ภาคผนวก ง รูปภาพประกอบวิธีการทดลอง	54
ประวัติผู้เขียน	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดของคอลลาเจน และการจำแนก	7
2.2	ตารางแสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาดุก หนังปลาฉลาม	17
4.1	แสดงปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน	32



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ปลาใบโพจุด (Spotted sicklefish)	3
2.2 โครงสร้างของโทรโปคอลลาเจน	5
2.3 โครงสร้างอันดับ 1, 2 และ 3 ของคอลลาเจน	5
2.4 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากผิวหนังและส่วนผสมของผิวหนัง และเกล็ดของปลาช่อน	9
2.5 รูปแบบโปรตีนของหนังของปลาสลิค (SS) คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังของปลาสลิค	10
2.6 รูปแบบ SDS-PAGE ของ ASC จากหนังปลาวักระดาษ	11
2.7 รูปแบบ SDS-PAGE ของคอลลาเจนจากหนังปลาหิน	12
2.8 รูปแบบ SDS-PAGE ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายน้ำด้วยเปปซินจากหนังปลากระเบนแดง	13
2.9 รูปแบบ SDS-PAGE ของคอลลาเจนจากเกล็ดปลาชาร์ติน	14
2.10 ขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลาย ด้วยเปปซิน (PSC)	15
2.11 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากปลาเซิร์ฟสมเลท	18
2.12 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาไหลทะเล คอลลาเจน type IV จากรกของมนุษย์ และแถบโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง	19
2.13 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาทุแขก และ ปลาจวด	20
2.14 ความสัมพันธ์ของการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาร็อคฟิช ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน	21
2.15 ความสัมพันธ์ของการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลิค ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน	22
2.16 ความสัมพันธ์ของการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาฉลามครีบดำ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน	23
2.17 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาตาหวานจุด	24
2.18 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลากระเบนหัวแหลม	24
2.19 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) นำไปใช้ประโยชน์ด้าน ไม่ว่ากรณีใดๆ สกัดจากหนังปลากระเบนแดง เนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้	25

4.1	รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจาก หนังปลาใบโพจุด (<i>Drepane punctata</i>) ภายใต้สภาวะ non-reducing และ reducing	33
4.2	Fourier transform infrared spectrum ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาใบโพจุด	35
4.3	การละลายสัมพันธ์ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาใบโพจุด ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ	36
4.4	การละลายสัมพันธ์ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาใบโพจุด ในสภาวะที่มี pH ต่าง ๆ	37



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

คอลลาเจนเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ ไกลซีน โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งประกอบเป็นลักษณะโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน (Jillian, 2022) คอลลาเจน (collagen) เป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีนเส้นใย (fibrous protein) พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) พบมากที่สุดในสัตว์ มีประมาณร้อยละ 30 ของโปรตีนทั้งหมด (Bailey และ Light, 1989) โดยคอลลาเจนพบได้ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ได้แก่ เอ็น ผิวหนัง กระดูก เส้นเลือด และ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Foegeding และคณะ, 1996) ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องหลายประเภท เช่น อาหาร การแพทย์ เกษษกรรม ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง เป็นต้น (ปวเรศวร์, 2563)

จากการรายงานของ Global Market Estimates (2022) มีรายงานการคาดการณ์ว่า การเติบโตของตลาดคอลลาเจนทั่วโลก ตั้งแต่ปี 2023 ถึง 2028 จะมีการเติบโตอยู่ที่ปีละ 5.5% และเมื่อเจาะลึกลงไปที่ระดับ Asia Pacific ในระยะเวลา 5 ปีจะเติบโตสูงกว่าถึง 6.5% ซึ่งมีอัตราการเติบโตสูงสุดอยู่ในแถบเอเชียรวมถึงประเทศไทยด้วย ในอุตสาหกรรมการผลิตคอลลาเจน วัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่คือ หนังวัวและหนังสุกร (Nagai และ Suzuki, 2002) มีรายงานว่าปี 2023 ตลาดของคอลลาเจนที่ได้มาจากวัว มีตลาดที่ใหญ่กว่าคอลลาเจนที่ได้จากปลาถึง 32% เพราะเป็นคอลลาเจนที่สกัดออกมาได้ง่ายกว่าทำให้สิ้นเปลืองพลังงานที่น้อยกว่า (Global Market Estimates, 2022) แต่คอลลาเจนที่สกัดจากวัวอาจก่อให้เกิดการแพ้ได้ (พญ.อารยะ มานะผจญ, 2565) อีกทั้งจากการระบาดของโรคติดเชื้ออิวบ้า (bovine spongiform encephalopathy: BSE) ทำให้คอลลาเจนจากวัวมีความเสี่ยง (Jongjareonrak และคณะ, 2005) และด้วยข้อจำกัดทางศาสนา คอลลาเจนจากวัวและสุกรจึงไม่สามารถใช้ได้กับผู้ที่นับถือศาสนาอิสลาม ศาสนาฮินดู และศาสนาฮิว (Shen และคณะ, 2007) ซึ่งคอลลาเจนจากปลานั้นได้รับความนิยมไม่แพ้กัน จึงสามารถเป็นแหล่งคอลลาเจนทางเลือกได้ ซึ่งมีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาหลากหลายสายพันธุ์ เช่น หนังปลาสิลิด (Sukkon และคณะ, 2020) และหนังปลาช่อน (Truong และคณะ, 2021) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลาใบโพจุดนั้น เป็นปลาทะเล มีหนังที่หนา (ลันตาปลาไทย, 2562) ซึ่งเป็นลักษณะทางกายภาพที่ดีในการนำหนังปลาใบโพจุดไปสกัดคอลลาเจน อีกทั้งยังมีราคาไม่แพง ทำให้ต้นทุนของวัตถุดิบในการสกัดคอลลาเจนต่ำ และเป็นการสร้างมูลค่าปลาใบโพจุดให้สูงขึ้นได้ จึงเป็นที่มาในการศึกษาเพื่อเป็นทางเลือกใหม่ โดยใช้ในการสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีการใช้กรด เพื่อศึกษาคุณลักษณะในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การวิเคราะห์หาปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน โครงสร้างระดับทุติยภูมิของคอลลาเจน ผลของโซเดียมต่อการละลายของคอลลาเจน และผลของค่าพีเอชต่อการละลายของคอลลาเจน ซึ่งจะต่อยอดไปสู่การเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบได้ รวมถึงเป็นวัตถุดิบทางเลือกในการผลิตคอลลาเจนเพื่อทดแทนคอลลาเจนจากวัวและสุกรได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์และพัฒนาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 เพื่อศึกษาการเตรียมคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุดด้วยวิธีการใช้กรด
- 1.2.2 เพื่อจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาใบโพจุด

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ได้ศึกษาขั้นตอนและวิธีการสกัดคอลลาเจนที่ละลายได้ด้วยกรด
- 1.3.2 ได้ศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลาใบโพจุด
- 1.3.3 เพิ่มมูลค่าให้กับปลาใบโพจุด และเพื่อเป็นทางเลือกในการใช้วัตถุดิบทดแทนการผลิตคอลลาเจนจากวัวและสุกร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

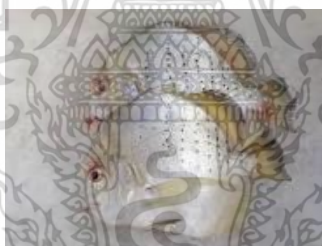
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลาใบโพจุด

ชื่อสามัญภาษาไทย คือ ปลาใบโพจุด ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ คือ Spotted sicklefish และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Drepane punctata* ชื่อท้องถิ่น คือ ปลาใบปอ ปลาแมลงปอ (ด้านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดสมุทรสาคร, 2563) โตเต็มที่มีขนาด 40 cm หนักประมาณ 2 kg เป็นปลาเนื้อขาว หนังหนา เนื้อนุ่ม นิยมเอาไปเผาทั้งตัว หรือสับทำแกงส้ม มีราคาประมาณกิโลกรัมละ 50-70 บาท (อาหารทะเลสด, 2566)

ลักษณะเด่นของปลาชนิดนี้คือ ลำตัวป้อมสั้นเกือบกลม ด้านข้างแบน คูคล้ายใบโพ อันเป็นที่มาของชื่อเรียก สันหลังโค้งนูน หัวค่อนข้างใหญ่ จะงอยปากสั้น นัยน์ตาโต บริเวณระหว่างตาโค้งนูนออกมา ปากเล็ก และยึดหดได้ มีฟันเล็กและแหลมคมบนขากรรไกรบนและล่าง ลำตัวด้านบนสีขาวยนเทาและมีจุดเล็ก ๆ สีส้มเรียงเป็นแถวขวางลำตัวจำนวน 4-11 แถว ปลาวัยอ่อนจะมีแถบสีดำในบริเวณที่เป็นจุดสีส้ม (ภาพที่ 2.1)

พบกระจายพันธุ์ตั้งแต่อินเดียจนถึงออสเตรเลียตอนเหนือ ในประเทศไทยพบได้ทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน (ด้านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดสมุทรสาคร, 2563)



ภาพที่ 2.1 ปลาใบโพจุด (Spotted sicklefish)

ที่มา: ลันตาปลาไทย (2562)

2.2 คอลลาเจน

คอลลาเจน (Collagen) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในสัตว์ ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) โดยมีประมาณร้อยละ 30 ของโปรตีนทั้งหมด (Bailey และ Light, 1989) มีอยู่ในสัตว์ทุกชนิด เนื่องจากเป็นส่วนประกอบสำคัญในกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น เอ็น กระดูกตา ผิวหนัง กระดูกอ่อน เป็นต้น โดยคอลลาเจนนั้น เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (Fibrous Protein) มีคุณสมบัติ อ่อนนุ่ม บิดงอได้ไม่ยืดหยุ่น มีความสามารถในการทนแรงดึงสูง มีความแข็งแรง และมีความยืดหยุ่น เมื่ออยู่ร่วมกับไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคอราติน (Soft Keratin) เมื่อเกิดการเสื่อมสภาพจะทำให้เกิดเป็นรอยเหี่ยว นอกจากนั้นคอลลาเจนยังทำให้หลอดเลือดแข็งแรงและกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ (สุกัญญา และ วิเชียร, 2551)

ซึ่งในร่างกายสัตว์แต่ละชนิดจะมีคอลลาเจนประมาณ 1 ใน 3 ของโปรตีนทั้งหมดในร่างกาย (Foegeding และคณะ, 1996) โดยที่ปริมาณคอลลาเจนจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อและอายุของสัตว์ (Balian และ Bowes, 1977) ส่วนลักษณะของคอลลาเจนโดยทั่วไปคล้ายคลึงกันจะต่างกันเพียงเล็กน้อย ในองค์ประกอบของกรดอะมิโน ซึ่งทำให้คุณสมบัติโดยทั่วไปของคอลลาเจนต่างกันไป ปัจจัยสำคัญที่พบว่ามีอิทธิพล คือ สายพันธุและชนิดของเนื้อเยื่อ (มาลัยวรรณ และ วรรณวิบูลย์, 2549)

ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในหลาย ๆ ด้าน อาทิ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง เป็นต้น โดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ ปัจจุบันได้รับความนิยมในการนำคอลลาเจนมาประยุกต์ใช้งานมากขึ้น อาทิ ผิวหนังเทียมสำหรับผู้ป่วยแผลไฟไหม้ ไหมเย็บแผล และใช้ในการขนส่งยา (นันทพร, 2550)

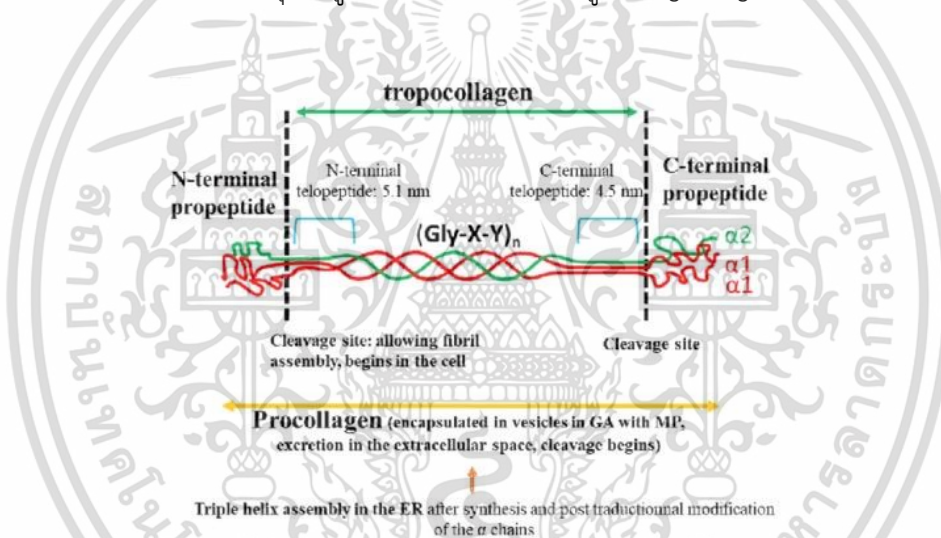
2.2.1 โครงสร้างของคอลลาเจน

คอลลาเจนมีโครงสร้างพื้นฐาน คือ โทโรโปคอลลาเจน (tropocollagen) โครงสร้างประกอบไปด้วยสายพอลิเปปไทด์ที่ขดกันเป็นเกลียวและหมุนไปทางซ้าย 3 สายมาพันกันเป็นเกลียวอีกครั้ง โดยทิศทางการบิดของเกลียวจะหมุนไปทางด้านขวา (Right-Handed Coiled Coil) (ภาพที่ 2.2) ได้โครงสร้างที่เรียกว่า Triple Helix (ภาพที่ 2.3) โดยภายในสายพอลิเปปไทด์แต่ละสายจะเกิดจากชุดของกรดอะมิโนของ (Gly-X-Y)_n มาเรียงตัวต่อ ๆ กันไปเป็นสายของพอลิเมอร์ที่ยาวขึ้น (นันทพร, 2550) โดยแต่ละสายจะมีกรดอะมิโนมากกว่า 1000 ตัวต่อกัน โดยทั่วไปจะประกอบด้วย กรดอะมิโนไกลซีน (Glycine: Gly) ประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมดในโมเลกุลคอลลาเจน และมีกรดอะมิโน (imino acid) ประมาณ 1 ใน 4 โดยแยกเป็น โพรลีนประมาณ 12% และไฮดรอกซีโพรลีนประมาณ 11% (Ward และ Courts, 1977) โดย X และ Y ส่วนใหญ่เป็น Proline (Pro) และ 4-Hydroxyproline (Hyp) โดย Hyp เป็นอนุพันธ์ของ Pro ที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH Group) ลงใน Pro โดยอาศัยเอนไซม์ และมีโคแฟกเตอร์เป็นกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid) หรือวิตามินซีช่วยในการเกิดปฏิกิริยาในชุดของกรดอะมิโน

โครงสร้างของคอลลาเจนจะมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อม ซึ่งจะมีผลทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรง และคงตัวมากขึ้น ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ยาก (นันทพร, 2550) ทำให้คอลลาเจนไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งโโทรโปคอลลาเจนจะเรียงตัวขนานกันโดยมีแรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander Waals force) และไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) เชื่อมระหว่างโโทรโปคอลลาเจนทำให้เกิดลักษณะเป็นเส้นใยของคอลลาเจน ซึ่งความแข็งแรงของคอลลาเจนโมเลกุลยังเกิดจากการสร้างพันธะเชื่อมต่อกันทั้งภายใน และระหว่างโมเลกุล (intra และ inter molecular cross linkage) (Foegeding และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว เรียกว่า ทีโลเปปไทด์โซน (telopeptide zone) (Creighton, 1993)

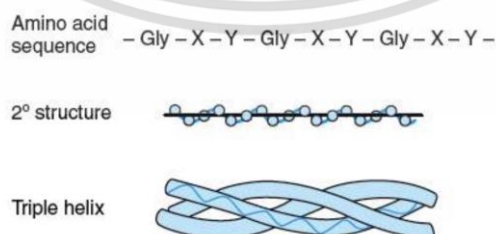
กรดอะมิโนในคอลลาเจน มีความไม่สมดุลทางโภชนาการ เช่น ขาดทริปโตเฟน แต่มีไกลซีน โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีนสูง และเป็นหนึ่งในโปรตีนเพียงไม่กี่ชนิดที่มีไฮดรอกซีไลซีน คอลลาเจนมีปริมาณไกลซีนเกือบ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด โดยกระจายตัวอยู่ทุก 3 ตำแหน่งตลอดโมเลกุลคอลลาเจน ยกเว้นตำแหน่งที่ 14 จากปลาย N และตำแหน่งที่ 10 จากปลาย C จากการศึกษาที่คอลลาเจนเป็นโปรตีนชนิดเดียวที่อุดมไปด้วยไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งมีมากถึงประมาณ 10% ของคอลลาเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และกรดอะมิโนชนิดไฮดรอกซีโพรลีนนี้ จะพบในโปรตีนชนิดอื่น ๆ ปริมาณน้อย ดังนั้น ไฮดรอกซีโพรลีนจึงมักเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างอาหาร

โพรลีนทำให้โครงสร้าง triple helix เสถียรโดยป้องกันการหมุนตัวของพันธะ N-C ส่วนไฮดรอกซีโพรลีนก็ช่วยทำให้โมเลกุลคอลลาเจนเสถียร คอลลาเจนที่มีปริมาณกรดอะมิโน (imino acid) ต่ำจะเสียสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่าคอลลาเจนที่มีกรดอะมิโนสูง พบว่าปริมาณกรดอะมิโนและความเสถียรต่อความร้อนของคอลลาเจนในปลามีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ (Foegeding และคณะ, 1996)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของโทรโปกคอลลาเจน

ที่มา: Tidu และคณะ (2005)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างอันดับ 1, 2 และ 3 ของคอลลาเจน

ที่มา: adyaniazizah (2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ชนิดของคอลลาเจน

การแบ่งประเภทของคอลลาเจนแบ่งตามมวลโมเลกุล การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน ความยาวของสายฮีลิกซ์ และคุณสมบัติของส่วนที่ไม่เป็นสายฮีลิกซ์

ปัจจุบันพบคอลลาเจน 28 ชนิด ดังตารางที่ 2.1 คอลลาเจนสี่ประเภทหลักคือ Type I, Type II, Type III และ Type IV (Lodish และคณะ, 2000)

คอลลาเจนประเภทที่ 1 (type I) ซึ่งพบมากถึง 90% ของคอลลาเจนทั้งหมดในร่างกาย ช่วยในการสร้างกระดูก ผนังหลอดเลือด เอ็นและเอ็นยึดกล้ามเนื้อ ผิวหนัง กระดูกตา และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีความเหนียวและแข็งแรงมากที่สุด

คอลลาเจนประเภทที่ 2 (type II) พบมากในกระดูกอ่อน เช่น ส่วนประกอบของหู จมูก หลอดลม และกระดูกซี่โครง

คอลลาเจนประเภทที่ 3 (type III) มักพบร่วมกับประเภทที่ 1 คือพบในผิว กล้ามเนื้อ และผนังหลอดเลือด

คอลลาเจนประเภทที่ 4 (type IV) พบใน basal lamina และ basement membrane ในส่วนของ epithelium-secreted layer (Gelse และคณะ, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของคอลลาเจน และการจำแนก

Type	Class	Composition	Distribution
I	Fibrillar	$\alpha 1(I)_2 \alpha 2(I)$	Abundant and widespread: dermis, bone, tendon and ligament
II	Fibrillar	$\alpha 1(II)_3$	Cartilage, vitreous
III	Fibrillar	$\alpha 1(III)_3$	Skin, blood vessel, intestine
IV	Network	$\alpha 1(IV)\alpha 2(IV)\alpha 3(IV)\alpha 4(IV)\alpha 5(IV)\alpha 6(IV)$	Basement membranes
V	Fibrillar	$\alpha 1(V)_3 \alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	Widespread: bone, dermis, cornea, placenta
VI	Network	$\alpha 1(IV)\alpha 2(IV)\alpha 3(IV)\alpha 1(IV)\alpha 2(IV)\alpha 4(IV)$	Widespread: bone, cartilage, cornea, dermis
VII	Anchoring fibril	$\alpha 1(VII)_2 \alpha 2(VII)$	Dermis, bladder
VIII	Network	$\alpha 1(VIII)_3 \alpha 2(VIII)_3 \alpha 1(VIII)_2 \alpha 2(VIII)$	Widespread: dermis, brain, heart, kidney
IX	FACIT ^a	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Cartilage, cornea, vitreous
X	Network	$\alpha 1(X)_3$	Cartilage
XI	Fibrillar	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	Cartilage, intervertebral disc
XII	FACIT	$\alpha 1(XII)_3$	Dermis, tendon
XIII	MACIT ^a	-	Endothelial cells, dermis, eye, heart
XIV	FACIT	$\alpha 1(XIV)_3$	Widespread: bone, dermis, cartilage
XV	MULTIPLEXIN ^b	-	Capillaries, testis, kidney, heart

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Type	Class	Composition	Distribution
XVI	FACIT	-	Dermis, kidney
XVII	MACIT	$\alpha 1(\text{XVII})_3$	Hemidesmosomes in epithelia
XVIII	MULTIPLEXIN	-	Basement membranes, liver
XIX	FACIT	-	Basement membranes
XX	FACIT	-	Cornea(chick)
XXI	FACIT	-	Stomach, kidney
XXII	FACIT	-	Tissue junctions
XXIII	MACIT	-	Heart, retina
XXIV	Fibrillar	-	Bone, cornea
XXV	MACIT	-	Brain, heart, testis
XXVI	FACIT	-	Testis, ovary
XXVII	Fibrillar	-	Cartilage
XXVIII	-	-	Dermis, sciatic nerve

ที่มา: Shoulders และ Raines (2009)

ซึ่งในการศึกษามักจะใช้คอลลาเจน Type I เนื่องจากมีปริมาณมากและมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในวงการแพทย์ ซึ่งคอลลาเจน Type I นี้พบได้ส่วนใหญ่ในสัตว์ชั้นสูง ในส่วนของเอ็น หนัง และกระดูก ซึ่งจะประกอบด้วย 3 สาย ได้แก่ สาย $\alpha 1$ (I) จำนวน 2 สาย และ $\alpha 2$ (I) จำนวน 1 สาย ซึ่งสาย $\alpha 1$ (I) และ $\alpha 2$ (I) จะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน คอลลาเจนชนิดนี้จะพบกรดอะมิโนชนิดไกลซีนประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด มีส่วนที่ไม่บิดเป็นเกลียวสั้น ประกอบด้วยไทโรซีนและฮิสติดีน ไม่พบทริปโตเฟนและซีสเทอีน (ตระกุล, 2552)

2.2.3 คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (Acid soluble collagen)

คอลลาเจนสามารถละลายในสารละลายกรดเจือจาง เช่น กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M กรดจะมีประสิทธิภาพในการสกัดคอลลาเจน มากกว่าการใช้สารละลายเกลือ พันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดเจือจาง แล้วทำให้ประจุบนไทโรซีนและฮิสติดีนผลักกัน ทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัว (Friess, 1998) คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรดเจือจางจะเป็นคอลลาเจน type I ซึ่งคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) มีขั้นตอนการสกัดดังแสดงใน (ภาพที่ 2.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาของ Thuy และคณะ (2020) การหาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายในกรดจากหนังและเกล็ดปลาช่อน (*Channa striata*) โดยสกัดตามวิธีของ Thuy และคณะ (2014) ซึ่งทุกขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจนทำที่อุณหภูมิ 4 °C หนังปลาช่อนถูกแช่และกวนเบา ๆ ใน NaOH 0.1 M เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 3 ชั่วโมง) เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออก กำจัดแร่ธาตุในหนังปลาโดย EDTA-2Na 0.8 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 12 ชั่วโมง) หลังจากปรับสภาพแล้วหนังปลาจะถูกล้างในน้ำกลั่นที่เย็นจนได้ค่า pH ที่เป็นกลาง สกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติก 0.5 M เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 9000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 °C แล้วจึงนำเอาสารละลายทั้งหมดที่สกัดได้มาตกตะกอนด้วยการใช้ NaCl โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.6 M โดยมี tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.05 M ที่ pH 7.0 นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 9000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 °C และไดอะไลซีในกรดอะซิติก 0.5 M นำไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 20 °C กัดได้จากหนังปลาช่อน (*Channa striata*) ประกอบไปด้วย α_1 , α_2 และสายโซ่ β เป็นส่วนประกอบหลัก และถูกระบุว่าเป็นคอลลาเจน type I (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากผิวหนังและส่วนผสมของผิวหนังและเกล็ดของปลาช่อน
ที่มา: Thuy และคณะ (2020)

จากการศึกษาของ Sukkon และคณะ (2020) ได้ศึกษาลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายในกรดจากหนังปลาสลิด สกัดตามวิธีของ Kittiphattanabawon และคณะ (2019) กระบวนการทั้งหมดถูกดำเนินการที่ 4 °C ภายใต้สภาวะการกวนอย่างต่อเนื่อง โปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนถูกกำจัดออกโดยการแช่หนังปลาที่เตรียมไว้ใน NaOH 0.1 M ที่อัตราส่วนของหนังปลาต่อสารละลายอัลคาไลที่ 1:15 (w/v) จากนั้นกวนอย่างต่อเนื่อง

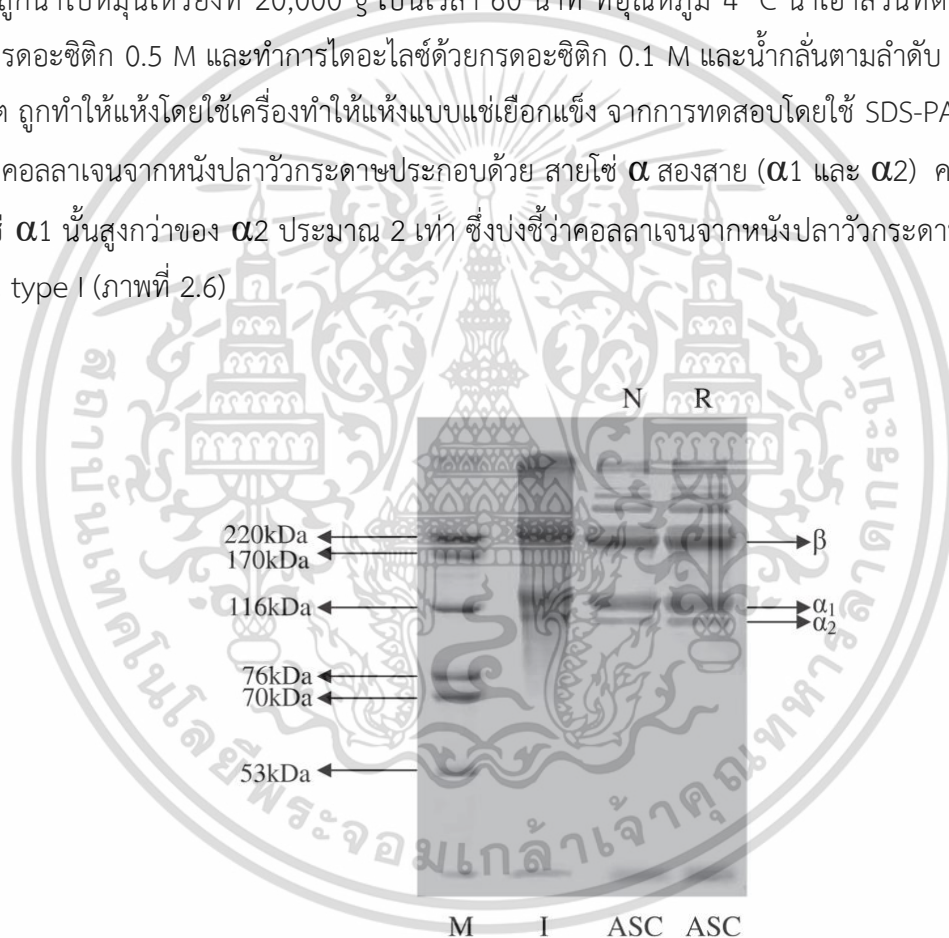
เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และสารละลายอัลคาไลถูกเปลี่ยนทุก ๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างหนังปลาด้วยน้ำเย็นเพื่อให้ได้ค่า pH ที่เป็นกลาง กำจัดไขมันโดยใช้บิวทิลแอลกอฮอล์ 10% ที่อัตราส่วนตัวอย่าง:ตัวทำละลาย 1:10 (w/v) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตัวทำละลายถูกเปลี่ยนทุก ๆ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างหนังปลาด้วยน้ำเย็น สกัดคอลลาเจนโดยการแช่หนังปลาที่เตรียมไว้ในกรดอะซิติก 0.5 M ที่อัตราส่วนของแข็ง:ตัวทำละลาย 1:15 (w/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากการสกัดนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองแยกสารเหนียวตะกอน และตกตะกอนโดยการเติม NaCl โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.6 M โดยมี Tris-HCl 0.05 M (pH 7.5) ทำการหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และละลายในกรดอะซิติก 0.5 M ตามด้วยการไดอะไลซิสด้วยกรดอะซิติก 0.1 M เป็นเวลา 2 วัน และน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 วัน โดยเปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 12 ชั่วโมง ไดอะไลซิสถูกทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง จากการทดสอบโดยใช้ SDS-PAGE รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากผิวหนังของปลาสดแสดงไว้ใน (ภาพที่ 2.5) ผลการศึกษาพบว่าคอลลาเจนจากหนังปลาสด ประกอบด้วยสายโซ่ $\alpha 1$ และสายโซ่ $\alpha 2$ ในอัตราส่วนประมาณ 2:1 แสดงว่าคอลลาเจน type I เป็นส่วนประกอบโปรตีนหลักในผิว มีข้อสังเกตว่า ASC ส่วนใหญ่มีแถบสายโซ่ β และสายโซ่ γ ที่เข้มที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่รายงานสำหรับคอลลาเจน type I



ภาพที่ 2.5 รูปแบบโปรตีนของหนังปลาสด (SS) คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังของปลาสด และ M หมายถึงเครื่องหมายโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลสูง
ที่มา: Sukkon และคณะ (2020)

จากการศึกษาของ Ahmad และคณะ (2010) ได้ศึกษาลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายในกรดที่สกัดจากหนังปลาวัวกระดาศ (Unicorn leatherjacket) ขั้นตอนทั้งหมดดำเนินการที่อุณหภูมิ 4 °C และสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาวัวกระดาศ ตามวิธีการของ Nalinanon และคณะ (2007) หนังปลาถูกแช่ใน NaOH ความเข้มข้น 0.1 M ด้วยอัตราส่วนของหนังต่อสารละลาย 1:20 (w/v) กวนอย่างต่อเนื่อง เพื่อกำจัดโปรตีนที่

ไมโซคอลลาเจนออก เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง และเปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างหนังปลาด้วยอัลคาไลน์และน้ำเย็นจนกระทั่ง pH เป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย กำจัดไขมันที่ตกค้างในหนังปลาโดยใช้บิวทิลแอลกอฮอล์ 10% (v/v) โดยมีอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย 1:10 (w/v) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำเย็น ในการสกัดคอลลาเจนจะนำหนังปลาที่เตรียมไว้ผสมกับกรดอะซิติก 0.5 M ที่มีอัตราส่วนของหนังต่อสารละลายที่ 1:15 (w/v) โดยของผสมถูกนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 g อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบาง ส่วนที่เหลืออยู่นำมาสกัดอีกครั้งในสภาวะเดิม แล้วจึงนำเอาสารละลายทั้งหมดที่สกัดได้มาตกตะกอนด้วยการเติมสารละลาย NaCl 2.6 M ที่มี tris(hydroxymethyl) aminomethane ที่ความเข้มข้น 0.05 M (pH 7.0) ตกตะกอนจะถูกนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 g เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำเอาส่วนที่ตกตะกอนมาละลายในกรดอะซิติก 0.5 M และทำการไดอะไลซิสด้วยกรดอะซิติก 0.1 M และน้ำกลั่นตามลำดับ หลังจากนั้นไดอะไลเซต ถูกทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากการทดสอบโดยใช้ SDS-PAGE รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังปลาวัวกระดาศประกอบด้วย สายโซ่ α สองสาย (α_1 และ α_2) ความเข้มข้นของแถบของโซ่ α_1 นั้นสูงกว่าของ α_2 ประมาณ 2 เท่า ซึ่งบ่งชี้ว่าคอลลาเจนจากหนังปลาวัวกระดาศ น่าจะเป็นคอลลาเจน type I (ภาพที่ 2.6)



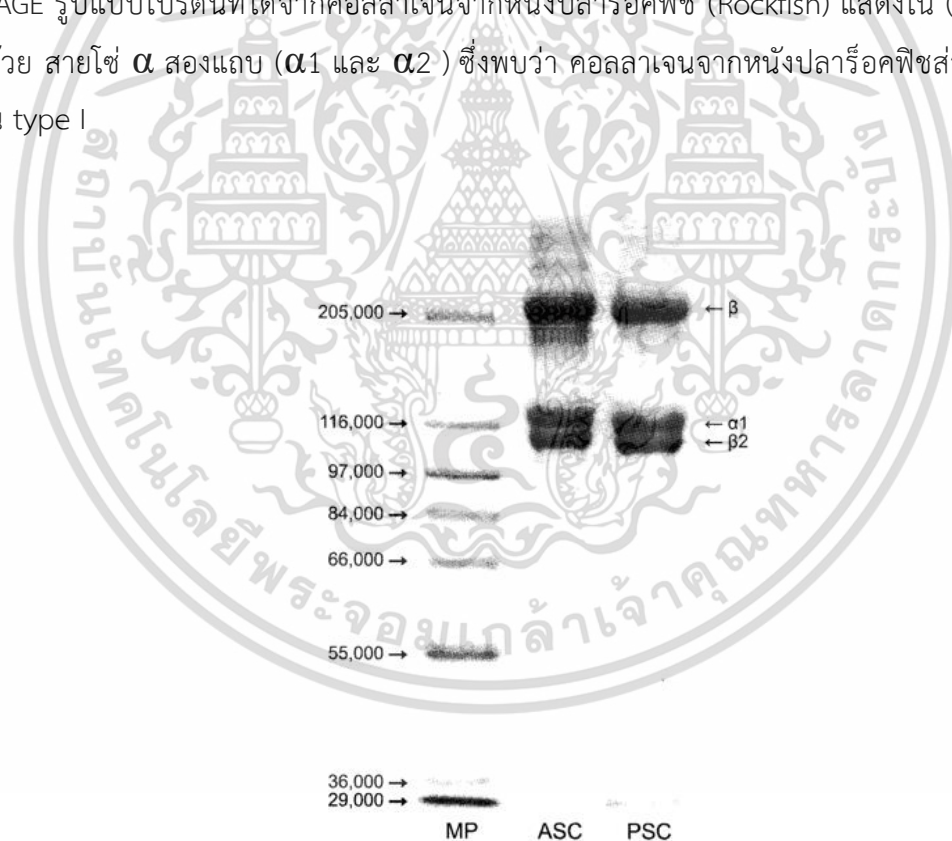
ภาพที่ 2.6 รูปแบบ SDS-PAGE ของ ASC จากหนังปลาวัวกระดาศ (Unicorn leatherjacket) ภายใต้สภาวะรีตีวซ์ (R) และไม่รีตีวซ์ (N) เครื่องหมายน้ำหนักโมเลกุลสูง (M) คอลลาเจนจากหนังลูกวัว type I (I) และคอลลาเจนที่ละลายในกรดจากหนังปลาวัวกระดาศ (Unicorn leatherjacket) (ASC)

ที่มา: Ahmad และคณะ (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 คอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (Pepsin soluble collagen)

จากการศึกษาของ Hyung และคณะ (2009) ได้ศึกษาลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายในกรดและเปปซินจากหนังปลาร็อคฟิช (Rockfish) โดยสกัดตามวิธีของ Park และคณะ (2007) และ Hwang และคณะ (2007) การวิเคราะห์ทั้งหมดดำเนินการที่อุณหภูมิ 4 °C นำหนังปลาที่ทำความสะอาดแล้วเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 N เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน ตามด้วยการกำจัดไขมันโดยใช้บิวทิลแอลกอฮอล์ 10% แล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นที่เย็น จากนั้นแช่หนังปลาที่เตรียมไว้ในกรดอะซิติก 0.5 M นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที ได้สารเหนียวตะกอนและตะกอน สกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (PSC) โดยนำตะกอนที่ได้แช่ในกรดอะซิติก 0.5 M ที่มีเปปซินที่อัตราส่วน 1:20 (w/w) เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที ได้สารเหนียวตะกอนและตะกอนออกมา จากนั้นนำสารเหนียวตะกอนไปเติม NaCl ปรับให้เป็นกลางและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที และไดอะไลซ์ด้วยกรดอะซิติก 0.5 M จากนั้นทำการไดอะไลซ์ต่อด้วยกรดอะซิติก 0.1 M และน้ำกลั่นตามลำดับ หลังจากนั้น ไดอะไลเซตถูกทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากการทดสอบโดยใช้ SDS-PAGE รูปแบบโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจนจากหนังปลาร็อคฟิช (Rockfish) แสดงใน (ภาพที่ 2.7) ประกอบด้วย สายโซ่ α สองแถบ ($\alpha 1$ และ $\alpha 2$) ซึ่งพบว่า คอลลาเจนจากหนังปลาร็อคฟิชส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจน type I



ภาพที่ 2.7 รูปแบบ SDS-PAGE ของคอลลาเจนจากหนังปลาร็อคฟิช (Rockfish) (MP-marker protein, ASC-acid soluble collagen; PSC-pepsin soluble collagen)

ที่มา: Hyung และคณะ (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาของ Chen และคณะ (2019) ได้ศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายในกรดและเปปซินจากหนังปลากระเบนแดง โดยสกัดตามวิธีของ Baderi และ Sarbon (2019) และ Zhao และคณะ (2018) โดยการเตรียมคอลลาเจนที่ละลายในกรด ดำเนินการทั้งหมดที่อุณหภูมิ 4 °C ชั้นแรกนำไปกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน โดยแช่ในสารละลาย NaOH 0.1 M ประมาณ 6 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่เย็นจนเป็นกลาง จากนั้นแช่ใน EDTA 0.5 M ที่ pH 7.4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น สกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (PSC) โดยใช้กรดอะซิติก 0.5 M ที่มีเปปซิน 1% (w/w) ที่อัตราส่วน 1:10 (w/v) หลังจากการสกัดจะตกตะกอนด้วย NaCl ประมาณ 2-5 % และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำไปไดอะไลซ์กับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.5 M และนำไปไดอะไลซ์อีกครั้งกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถูกทำให้แห้งแล้วเก็บในที่เยือกแข็งประมาณ -20 °C จากการทดสอบโดยใช้ SDS-PAGE รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากปลากระเบนแดง ประกอบด้วยสายโซ่ α ที่แตกต่างกันสองประเภท ($\alpha 1$ และ $\alpha 2$) โดยมีอัตราส่วนความเข้มข้นของสายโซ่ $\alpha 1$ สูงกว่าสายโซ่ $\alpha 2$ ประมาณ 2 เท่า ซึ่งบ่งชี้ว่าคอลลาเจนจากปลากระเบนแดงเป็นคอลลาเจน type I (ภาพที่ 2.8)

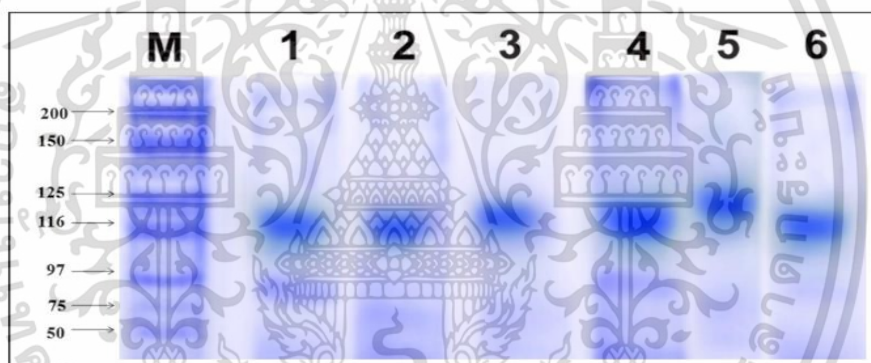


ภาพที่ 2.8 รูปแบบ SDS-PAGE ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (PSC) จากหนังปลากระเบนแดง Lane 1: เครื่องหมายโปรตีนมาตรฐาน Lane 2: คอลลาเจนจากเส้นเอ็นหางหนู Lane 3: คอลลาเจนจาก ASC ของหนังปลากระเบนแดง Lane 4: คอลลาเจนจาก PSC ของหนังปลากระเบนแดง

ที่มา: Chen และคณะ (2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

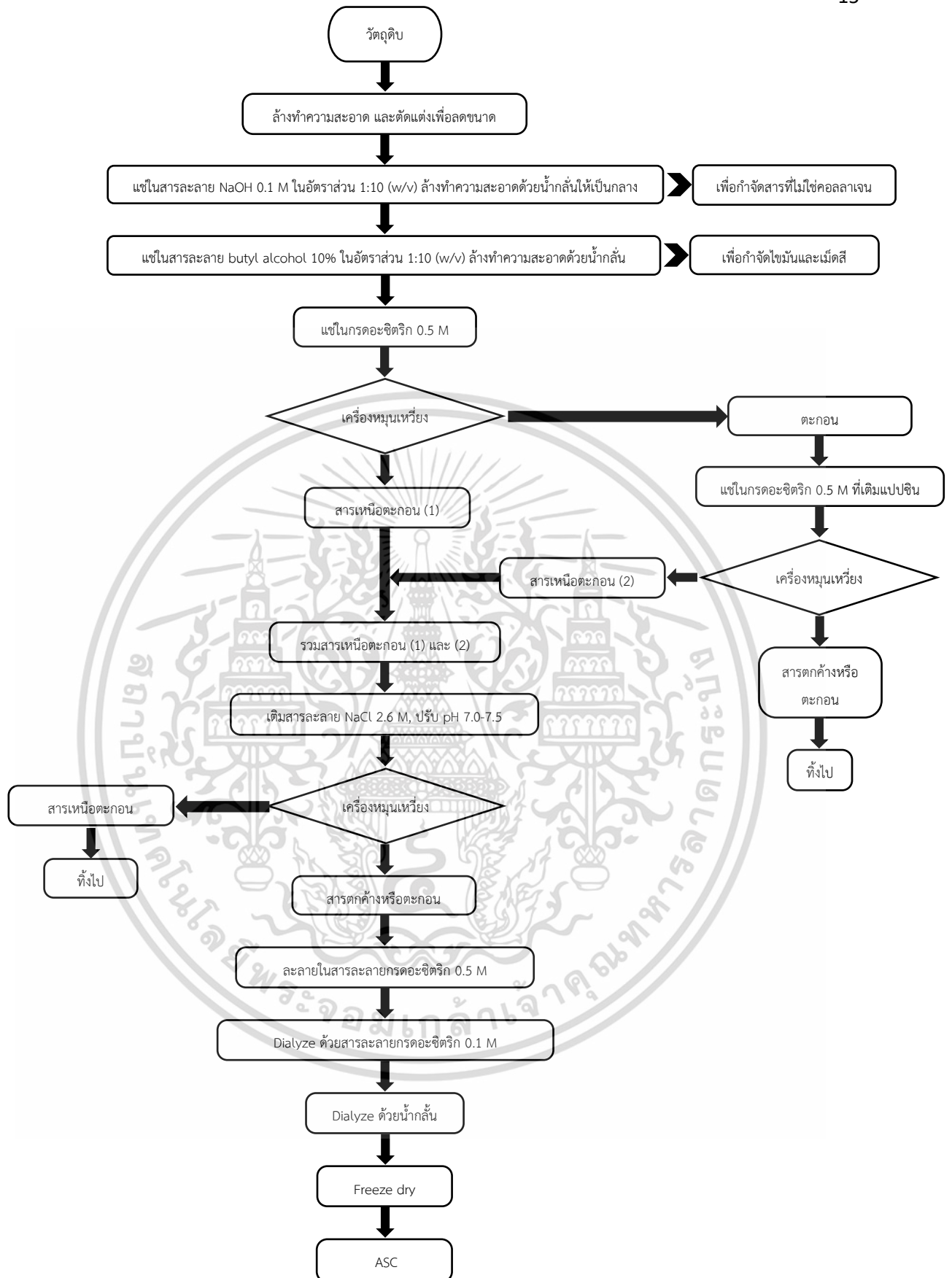
จากการศึกษาของ Srinivasan และ Durairaj (2021) ได้ศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนจากหนังปลาชาร์ดินอินเดีย โดยสกัดตามวิธีของ Silvipriya และคณะ (2015) นำหนังปลาแช่ในสารละลาย NaOH 10% และกวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน กระบวนการทั้งหมดดำเนินการที่อุณหภูมิ 4 °C กำจัดแร่ธาตุโดยใช้สารละลาย HCl 0.4 M เป็นเวลา 90 นาที นำหนังปลาไปแช่ในสารละลายบิวทานอล 10% และกวนอย่างต่อเนื่อง เพื่อกำจัดไขมันออก สกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติก 0.5 M เป็นเวลา 4 วัน และหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ได้สารเหนียวตะกอนและตะกอน จากนั้นสกัดคอลลาเจน ที่ละลายด้วยเปปซิน โดยนำตะกอนแช่ในกรดอะซิติก 0.5 M ที่มีเปปซิน 1.5% ในอัตราส่วน 1:15 (w/v) เป็นเวลา 4 วัน กรองโดยใช้กระดาษกรอง และทำการตกตะกอน ไดอะไลเซตโดยการล้างด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.5 M ตามด้วยการไดอะไลซ์ด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้นไดอะไลซ์ด้วย น้ำกลั่น และนำไปทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง จากการทดสอบโดยใช้ SDS-PAGE โครงสร้างคอลลาเจนจากหนังปลาชาร์ดินอินเดีย ประกอบด้วยสายโซ่ α สองสาย ($\alpha 1$ และ $\alpha 2$) $\alpha 1$ และเครื่องหมายแสดงน้ำหนักโมเลกุลแสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนจากหนังปลาชาร์ดินอินเดียเป็น type I (ภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 รูปแบบ SDS-PAGE ของคอลลาเจนจากเกล็ดปลาชาร์ดิน Lane 1: เครื่องหมายโปรตีน (M); Lane 2: -ASC (เกล็ด); Lane 3: -PSC (เกล็ด); Lane 4: ASC- (ผิวหนัง); Lane 5: ASC- (กล้ามเนื้อ) และ Lane 6: PSC- (กล้ามเนื้อ)

ที่มา: Srinivasan และ Durairaj (2021)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.10 ขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน (PSC) ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้... ที่มา: Benjakul และคณะ (2012) ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 คุณลักษณะของคอลลาเจน

2.2.5.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโน (Amino acid composition)

จากการศึกษาของ Abdelaal และคณะ (2021) ได้ศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาดุก (Catfish) มีวิธีการศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนโดย ตัวอย่างคอลลาเจนถูกไฮโดรไลซ์ใน HCl ความเข้มข้น 6 N ที่ 110 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไฮโดรไลเสตถูกวิเคราะห์โดย HPLC เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Ishida และคณะ, 1981) ผลการทดลองพบว่า มีปริมาณไกลซีนมากที่สุดคิดเป็น 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด รองลงมาคือ ไลซีน ตามด้วยโพรลีน กรดกลูตามิก และไฮดรอกซีโพรลีน มีซิสเทอีน เมไทโอนีน และฮิสติดีนต่ำมาก และมีปริมาณกรดอะมิโน เท่ากับ 166 residues/1000 residues ซึ่งคล้ายกับปลาปักเป้า และปลาทรายแดง (Huang และคณะ, 2011 และ Nalinanon และคณะ, 2011)

จากการศึกษาของ Ge และคณะ (2022) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเปปซินที่สกัดจากหนังปลาฉลามครีบดำ (Blacktip Reef Shark Skin) มีวิธีการศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Hitachi LA-8080, Tokyo, Japan) คอลลาเจนถูกไฮโดรไลซ์อย่างสมบูรณ์ใน HCl ความเข้มข้น 6 M ที่ 110 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวทำละลายถูกระเหยภายใต้สุญญากาศจนกระทั่งตัวอย่างแห้ง จากนั้นจึงละลายในน้ำกลั่น ตัวอย่างที่แห้งถูกละลายโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรต (pH 2.2) ในปริมาณที่น้อยที่สุด และกรองผ่านเมมเบรน 0.45 nm. และใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนได้รับการสอบเทียบด้วยรีเอเจนต์มาตรฐาน ผลการทดลองพบว่า มีปริมาณไกลซีนเป็นกรดอะมิโนหลัก ตามด้วยโพรลีน และไลซีน ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Ahmad และคณะ (2010) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาวัวกระดาด (Unicorn leatherjacket) มีวิธีการศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนโดย ตัวอย่างคอลลาเจนถูกไฮโดรไลซ์ในกรดมีเทนซัลโฟนิก ความเข้มข้น 4 M ที่มีอินโดล 0.2% (v/v) และ 3-(2-อะมิโนเอทิล) ที่ 115 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไฮโดรไลเสตถูกทำให้เป็นกลางด้วย NaOH ความเข้มข้น 3.5 M และเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ซิเตรต ความเข้มข้น 0.2 M (pH 2.2) สารละลายตัวอย่างจำนวน 0.4 ml ถูกนำไปใช้กับเครื่องวิเคราะห์ กรดอะมิโน (MLC-703; Atto Co., Tokyo, Japan) ผลการทดลองพบว่า มีปริมาณไกลซีนมากที่สุดคิดเป็น 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด รองลงมาคือ ไลซีน ไหมบซิสเตอีน และทริปโตเฟน และมีปริมาณกรดอะมิโน 190 residues/1000 residues ซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโนต่ำกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาวัวที่มีกรดอะมิโน 215 residues/1000 residues ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Jongjareonrak และคณะ (2005) (ตารางที่ 2.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาตูก หนังปลาฉลาม ครีบดำ และหนังปลาหัวกระต่าย

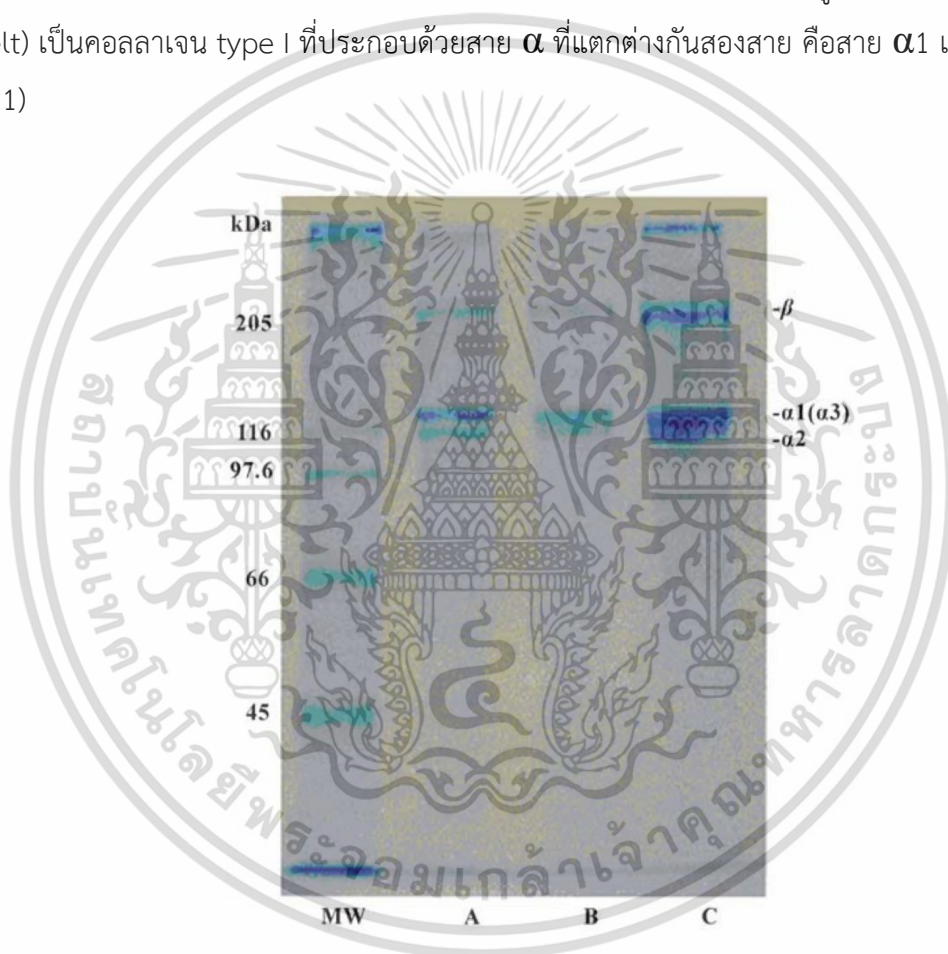
กรดอะมิโน	ปลาตูก	ปลาฉลาม ครีบดำ	ปลาหัวกระต่าย
ไกลซีน	228	292	321
โพรลีน	95	195	109
ไฮดรอกซีโพรลีน	71	92	81
กรดแอสปาดิก	55	38	45
ซีรีน	49	38	33
กรดกลูตามิก	85	66	74
ฮีสทีดีน	8	7	6
อาร์จินีน	79	43	53
ธรีโอนีน	36	20	27
อะลานีน	102	103	141
ซิสเตอีน	1	0	0
ไทโรซีน	26	1	4
วาเลอีน	22	21	21
เมทไธโอนีน	11	3	13
ไลซีน	69	21	27
โอโซลิวซีน	11	18	9
ลิวซีน	26	23	17
ฟีนิลอะลานีน	19	11	13
ไฮดรอกซีไลซีน	0	0	5
รวมทั้งหมด	1000	1000	1000

ที่มา: Abdelaal และคณะ (2021); Ge และคณะ (2022); Ahmad และคณะ (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5.2 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน

จากการศึกษาของ Nagai และคณะ (2010) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากปลาเซิร์ฟสมลท์ (Surf Smelt) โดยทำ SDS-PAGE ตามวิธีของ Nagai และคณะ (2002) ดำเนินการโดยการนำ คอลลาเจน (โปรตีน 50 mg) ละลายใน Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 M, pH 6.8, SDS 2% (w/v), กลีเซอรอล 25% (v/v) และ β -mercaptoethanol ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 50 mA โดยใช้เจลเข้มข้น 7.5% เจลถูกย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (R-250) 0.25% (w/v) (Fluka Fine Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) ที่มีเอทานอล 25% (v/v) และกรดอะซิติก 10% (v/v) และล้างเจลด้วย เมทานอล 5% (v/v) และกรดอะซิติก 7.5% (v/v) ผลการทดลองพบว่า คอลลาเจนที่สกัดจากหนังและกระดูกของปลาเซิร์ฟสมลท์ (Surf Smelt) เป็นคอลลาเจน type I ที่ประกอบด้วยสาย α ที่แตกต่างกันสองสาย คือสาย α_1 และสาย α_2 (ภาพที่ 2.11)



ภาพที่ 2.11 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาเซิร์ฟสมลท์ (Surf Smelt) (MW): แสดงถึงแถบโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (A): แสดงถึงคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาเซิร์ฟสมลท์ (Surf Smelt) (B): แสดงถึงคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากกระดูกของปลาเซิร์ฟสมลท์ (Surf Smelt) (C): แสดงถึงคอลลาเจนจากหนังหมู ตามลำดับ

ที่มา: Nagai และคณะ (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาของ Veeruraj และคณะ (2013) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเปปซินที่สกัดจากหนังปลาไหลทะเล โดยทำ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้เจลอะคริลาไมด์เข้มข้น 12 % นำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเจลถูกย้อมด้วยเมทานอล, กรดอะซิติก และ Coomassie brilliant blue (R250) (80:20:0.3) จากนั้นล้างเจลโดยใช้สารละลายเมทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (40:10:50) จากการทดลองพบว่า คอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาไหลทะเล เป็นคอลลาเจน type I เนื่องจากประกอบด้วยสาย $\alpha 1$ และ สาย $\alpha 2$ ในอัตราส่วนประมาณ 2:1 ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของคอลลาเจน type I (ภาพที่ 2.12)

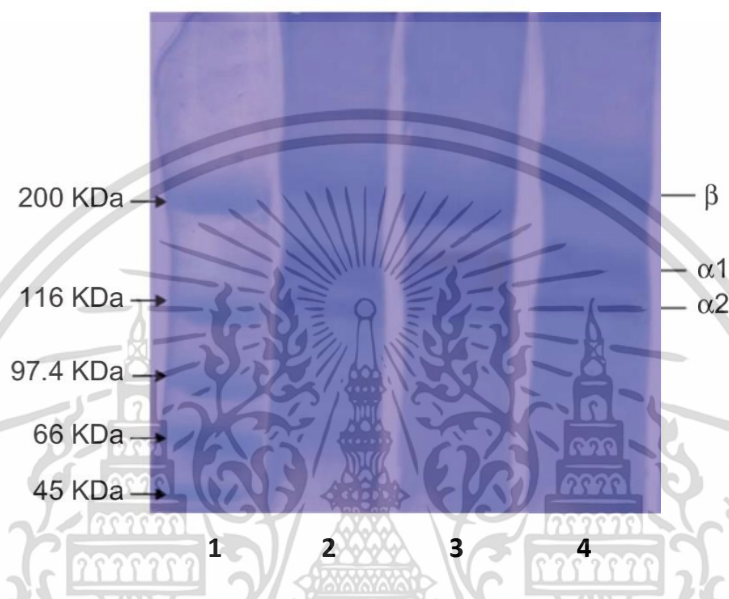


ภาพที่ 2.12 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาไหลทะเล (แถบที่ 1) คอลลาเจน type IV จากรกของมนุษย์ (แถบที่ 2) และแถบโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (แถบที่3)

ที่มา: Veeruraj และคณะ (2013)

จากการศึกษาของ Kumar และ Nazeer (2013) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเปปซินสกัดจากหนังปลาทูแขก (Horse mackerel) และปลาจวด (Croaker) โดยทำ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดย ตัวอย่างคอลลาเจนถูกละลายในบัฟเฟอร์ตัวอย่างที่มี β -mercaptoethanol 10% (v/v) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1 mg/ml นำสารละลายทั้งหมดมาผสม และต้มเป็นเวลา 5 นาที หลังจากอิเล็กโตรโฟรีซิส (100 V) เจลถูกย้อมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้สารละลาย Coomassie brilliant

blue (R250) 0.25% (w/v) และชะล้างโดยใช้กรดอะซิติก 7.5% (v/v) และ เมทานอล 5% (v/v) จากผลการทดลองพบว่า คอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาหูแหก (Horse mackerel) และปลาจวด (Croaker) ประกอบด้วยสาย $\alpha 1$ และ สาย $\alpha 2$ และตำแหน่งของสายโซ่ของคอลลาเจนจากปลาทั้งสองนั้นคล้ายคลึงกับตำแหน่งของคอลลาเจน type I จากหนังลูกวัว ดังนั้นส่วนประกอบหลักของคอลลาเจนที่สกัดได้ คือ คอลลาเจน type I



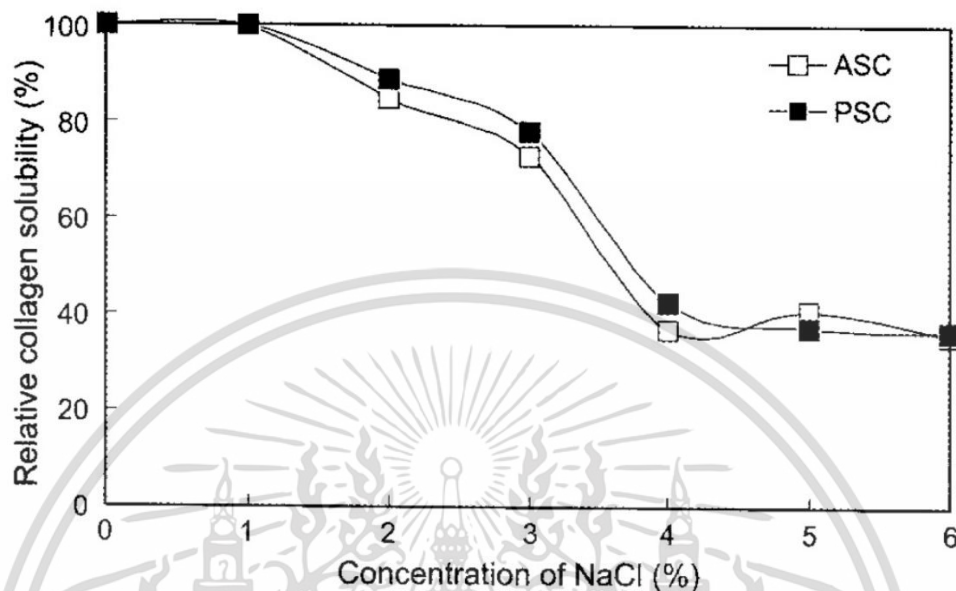
ภาพที่ 2.13 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาหูแหก (Horse mackerel) และปลาจวด (Croaker) แถบที่ 1 แสดงถึงแถบโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง แถบที่ 2 แสดงถึงคอลลาเจน type I แถบที่ 3 และ 4 แสดงถึง ASC จากหนังปลาหูแหก และปลาจวด ตามลำดับ

ที่มา: Kumar และ Nazeer (2013)

2.2.5.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการละลายของคอลลาเจน

จากการศึกษาของ Kim และคณะ (2009) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเปปซินที่สกัดจากหนังปลาร็อคฟิช (Rockfish) โดยการนำคอลลาเจน 5 ml (6 mg/ml) ผสมในกรดอะซิติก 0.5 M และผสมกับ NaCl 5 ml ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0%-6% (w/v)) ในกรดอะซิติก 0.5 M กวนอย่างต่อเนื่องที่ 5 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปั่นแยกที่ 20,000 g ที่ 5°C เป็นเวลา 30 นาที จากผลการทดลอง พบว่าความสามารถในการละลายของคอลลาเจนค่อย ๆ ลดลงตามความเข้มข้นของ NaCl ที่เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึง 3% (w/v) และลดลงอย่างรวดเร็วที่ 4% (w/v) หลังจากนั้นจะคงที่ การลดลงของความสามารถในการละลายคอลลาเจนที่ความเข้มข้นของ NaCl สูง คาดว่ามีสาเหตุหลักมาจากปรากฏการณ์ของการเกิดเกลือ ผลการละลายของคอลลาเจนจากหนังปลาร็อคฟิชที่ pH ต่าง ๆ เป็นไปตามรายงานก่อนหน้านี้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

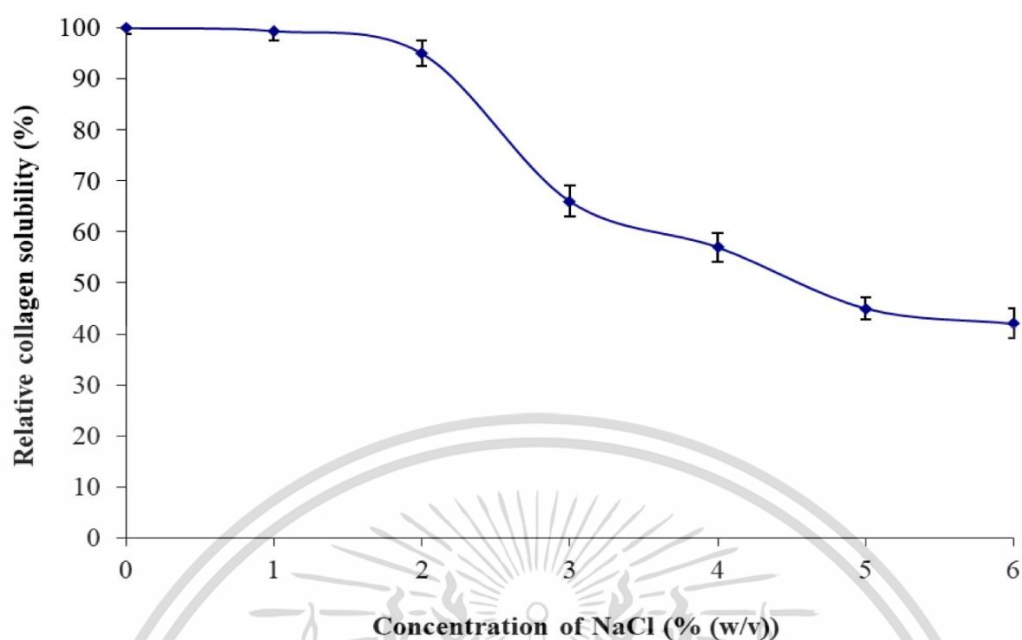
ของคอลลาเจนจากหนังของปลากะพงแดง (Jongjareonrak และคณะ, 2005) และปลาเทราท์ (Montero และคณะ, 1991)



ภาพที่ 2.14 ความสัมพันธ์ของการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากปลาร็อคฟิช (Rockfish) ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน
ที่มา: Kim และคณะ (2009)

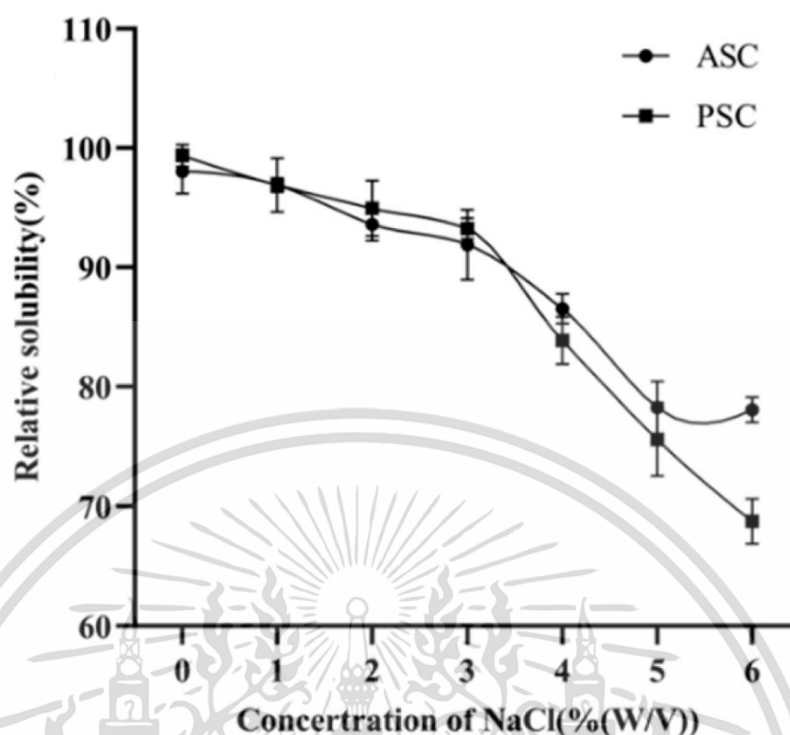
จากการศึกษาของ Snkkon และคณะ (2020) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสด โดยการตัวอย่างถูกละลายในกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 M อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 6 mg/ml นำสารละลายที่ได้ปริมาณ 5 ml ผสมกับกรดอะซิติก 0.5 M และเติม NaCl 5 ml ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6% (w/v)) กวนอย่างต่อเนื่องที่ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ปริมาณโปรตีนในสารเหนือตะกอนถูกวัดโดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) จากผลการทดลองความสามารถในการละลายของคอลลาเจนค่อย ๆ ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เกิน 2% และความสามารถในการละลายลดลงมากที่สุดเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 6% ผลลัพธ์นี้เป็นไปตามรายงานการละลายของคอลลาเจนจากหนังหัวครีบลีอง ปลากะเบนแดง ปลากะพงตาโต และปลาดุกในสารละลายกรดอะซิติกโดยทั่วไปลดลง ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมที่เพิ่มขึ้น (Jongjareonrak และคณะ, 2005; Kittiphattanabawon และคณะ, 2005) ผลกระทบนี้อาจเกิดจากการ “salting out” ของคอลลาเจน ซึ่งเกิดขึ้นที่ความเข้มข้นของ NaCl ที่ค่อนข้างสูง (Singh และคณะ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.15 ความสัมพันธ์ของการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสด ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน
ที่มา: Snkkon และคณะ (2020)

จากการศึกษาของ Ge และคณะ (2022) ได้ศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเปปซินสกัดจากหนังปลาฉลามครีบดำ (Blacktip Reef Shark Skin) โดยนำสารละลายคอลลาเจน 5 ml ผสมกับ NaCl 5 ml ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (0-12% (w/v)) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1-6% (w/v) กวนอย่างต่อเนื่อง ที่ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที และหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือจาก 0-6% ทำให้ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนลดลงจาก 100% เป็น 70% ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนค่อย ๆ ลดลงที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 3% หลังจากนั้นพบว่าการละลายของคอลลาเจนลดลงอย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 2.16 ความสัมพันธ์ของการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาฉลามครีบดำ (Blacktip Reef Shark Skin) ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน
ที่มา: Ge และคณะ (2022)

2.2.5.4 ความคงตัวต่อความร้อน

จากการศึกษาของ Oslan และคณะ (2022) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเปปซินที่สกัดจากหนังปลาทาหวานจุด (Purple-Spotted Bigeye Snapper) โดยใช้เทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) ใช้วิธีการของ Seixas และคณะ (2020) โดยการนำตัวอย่างแช่ในกรดอะซิติก 0.05 M ที่อัตราส่วนของแข็งต่อสารละลายที่ 1:40 (w/v) เป็นเวลา 2 วัน รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C DSC ถูกดำเนินการโดยใช้ Model DSC 7 (Norwalk, CT, USA) การสอบเทียบอุณหภูมิดำเนินการโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์แบบอินเดียม ตัวอย่าง (5–10 mg) ถูกชั่งน้ำหนักอย่างแม่นยำแล้วปิดผนึกในภาชนะสุญญากาศและถูกสแกนที่อัตรา 1 °C/min ในช่วงอุณหภูมิ 20–50 °C โดยใช้ไนโตรเจนเหลว เพื่อให้สารละลายเย็นค่าเอนทัลปีของการทำให้เสียสภาพทั้งหมด (ΔH) วิเคราะห์โดยวัดพื้นที่ของ DSC thermogram เพื่อหาอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสูงสุด (T_{max}) จากผลทดลอง T_{max} ของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาทาหวานจุดที่ละลายด้วยกรดอะซิติก-ASC, กรดแลคติก-ASC และกรดซิตริก-ASC เท่ากับ 31.4, 31.7 และ 31.5 °C ตามลำดับ (ภาพที่ 2.17) T_{max} ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาทาหวานจุดนั้นต่ำกว่าของสัตว์บก เช่น หนังกว้าว (37 °C) (Ahmed และคณะ, 2019) ความผันแปรของ T_{max} ระหว่างคอลลาเจน

จากสปีชีส์ต่าง ๆ อาจสัมพันธ์กับปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ ปริมาณไฮดรอกซีเลชันของโพรลีนตกค้าง โดยเฉพาะระดับ ไฮดรอกซีโพรลีน อุณหภูมิของระบบนิเวศ และอุณหภูมิของร่างกาย (Xu และคณะ, 2017)

Characteristics	Acetic Acid-ASC	Lactic Acid-ASC	Citric Acid-ASC
Transition temperature, T_{max} ($^{\circ}\text{C}$)	31.4 ± 0.53^a	31.7 ± 0.32^a	31.5 ± 0.71^a

Means \pm SD from triplicate determinations. Different letters (a-d) in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$).

ภาพที่ 2.17 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาตาหวานจุด (Purple-Spotted Bigeye Snapper)
ที่มา: Oslan และคณะ (2022)

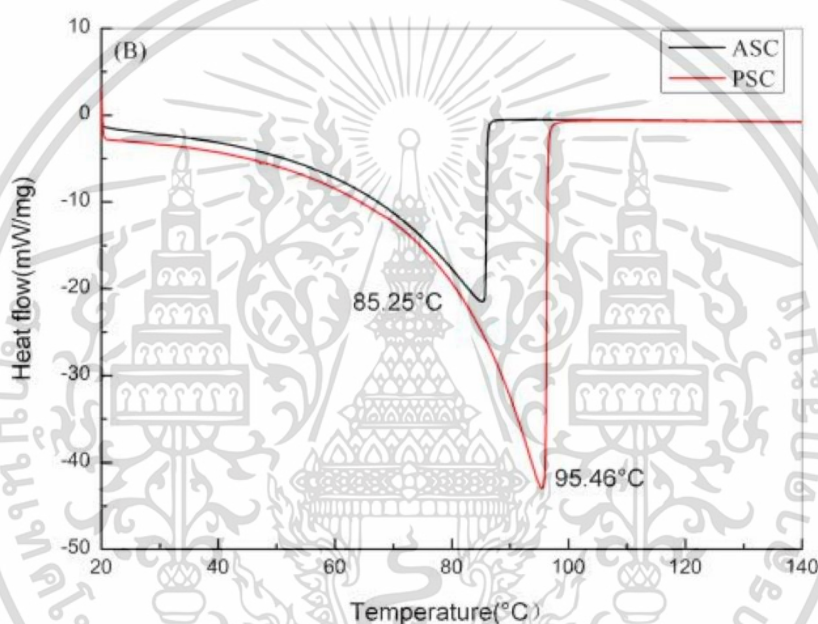
จากการศึกษาของ Ong และคณะ (2021) มีการศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด และเปปซินที่สกัดจากหนังปลากระเบนหัวแหลม (*Dasyatis zugei*) โดยใช้เทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) ตามวิธีการของ Kaewdang และคณะ (2014) คอลลาเจนที่สกัดออกมาในรูปแบบผง ถูกเติมน้ำที่ปราศจากไอออนในอัตราส่วนของแข็งต่อสารละลายที่ 1:20 (w/v) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่ 4°C เป็นเวลา 2 วัน ก่อนการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดปริมาณความร้อนด้วยการสแกนดิฟเฟอเรนเชียล (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) สอบเทียบโดยใช้เทอร์โมแกรมอินเดียม ตัวอย่าง 5 mg ใส่ลงในถาดอะลูมิเนียมและปิดผนึก ตัวอย่างถูกสแกนที่ $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ในช่วง $20 - 50^{\circ}\text{C}$ โดยใช้น้ำเย็นเป็นตัวกลางในการทำความเย็น อุณหภูมิการเปลี่ยนภาพสูงสุด (T_{max}) ประมาณจากเทอร์โมแกรมที่ได้รับ เอนทัลปีของการทำให้เสียสภาพรวม (ΔH) ประมาณโดยการวัดพื้นที่ของเทอร์โมแกรม DSC จากผลการทดลอง T_{max} ของคอลลาเจนจากหนังปลากระเบนหัวแหลม เท่ากับ $31.94 \pm 0.13^{\circ}\text{C}$ ความคงตัวทางความร้อนของคอลลาเจนมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณกรดอะมิโนของคอลลาเจน การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนโดยปกติคือ กรดอะมิโน โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีนจะเพิ่มเสถียรของโครงสร้างของคอลลาเจน (Nalinanon และคณะ, 2011)

Collagen	T_{max} ($^{\circ}\text{C}$)	Enthalpy (J/g)
ASC	31.94 ± 0.13^a	0.59 ± 0.062^a

ภาพที่ 2.18 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลากระเบนหัวแหลม (*Dasyatis zugei*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการที่มาจาก: Ong และคณะ (2021) ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาของ Huang และคณะ (2011) ได้ศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด และเปปซินสกัดจากหนังปลากระเบนแดง (Red Stingray) โดยใช้เทคนิค DSC โดยการผสมตัวอย่างกับกรดอะซิติก 0.5 M ในอัตราส่วน 1: 40 (w/v) และเก็บไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 2 วัน นำสารละลายประมาณ 5-10 mg ใส่ลงในภาชนะอะลูมิเนียม และตั้งค่าเครื่อง differential scanning calorimeter ดังนี้ ช่วงอุณหภูมิ 20-140 °C อัตราการให้ความร้อน 1 °C/min การไหลของไนโตรเจน 50 ml/min จากผลการทดลอง Tmax ของคอลลาเจนจากหนังปลากระเบนแดง เท่ากับ 85.25 °C คอลลาเจนจากสัตว์บกโดยทั่วไปจะมีความเสถียรมากกว่าคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ ความเสถียรนี้ยังได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่กำหนด และอุณหภูมิของที่อยู่อาศัยด้วย (Muyonga, 2004)



ภาพที่ 2.19 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) สกัดจากหนังปลากระเบนแดง (Red Stingray)
ที่มา: Huang และคณะ (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

หนังปลาใบโพจุด (*Drepane punctata*) ได้วัตถุดิบปลาใบโพจุดจาก ตลาดยิ่งเจริญ เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร เก็บรักษาโดยบรรจุกล่องโพลีไสตริ่งที่มีน้ำแข็ง โดยมีอัตราส่วนของปลาต่อน้ำแข็ง เท่ากับ 1:2 (w/w) นำมาที่คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากนั้นทำความสะอาดด้วยประปา บรรจุลงในถุงโพลีเอทิลีนเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

3.1.2 สารเคมี

กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4)

กรดซิตริก ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)

กรดบอริก (H_3BO_3)

กรดเปอร์คลอริก (HClO_4)

กรดอะซิติก (CH_3COOH)

กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

คลอรามินที (Chloramine T)

คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)

เซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin (BSA))

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS)

โซเดียมอะซิเตท ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

ไตรโซเดียมซิเตรท ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)

ทริส (Tris(hydroxymethyl) aminomethane)

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นให้ผมเห็นแต่เพียงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิโตรเลียมอีเทอร์ ที่มีจุดเดือด 40-60 °C (Petroleum Ether 40-60°C)
 พารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (p-dimethyl amino benzaldehyde)
 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
 โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)
 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
 เมทธีลีนบลู (Methylene Blue)
 ยูเรีย (Urea)
 ไอโซโพรพานอล (C_3H_8O)
 Beta-Mercaptoethanol
 Coomassie Blue R-250

3.2 อุปกรณ์

กระบอกตวง (Cylinder)
 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
 ควอร์ต คิวเวท (Quartz Square Cuvette) รุ่น UV-1200
 เครื่องกวนสาร เครื่องใหญ่ (Magnetic stirrer) รุ่น MS-M-S10
 เครื่องกวนสาร เครื่องเล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น C-MAG HS 7
 เครื่องกวนสาร (Overhead stirrer) รุ่น IKA RW 20 digital Germany
 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance 4 Digits) รุ่น AS 220.R2
 เครื่องแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) รุ่น CoolSafe 55-4 Pro
 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Refrigerated Centrifuge eppendorf: รุ่น 5910R
 เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrometer) รุ่น Nicolet 6700
 เครื่องวิเคราะห์ทางความร้อน (Differential Scanning Calorimeter) รุ่น Discovery DSC25
 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น V-1200
 ตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven) รุ่น DAIHAN ON105

เอกสารนี้เป็นเอกสารตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โถดูดความชื้น (Desiccator)

ที่คีบ (Tong)

แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic Stirring Bars)

บิวเรต (burette)

ปีกเกอร์ (Beaker)

พีเอชมิเตอร์ แบบดิจิทัล (PH Digital Meter) รุ่น Mettler-toledo AG 8603

Schwerzenbach

หลอดทดลอง (Test Tube)

หลอดย่อยโปรตีน (Digestion Tube)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WNB 14

อ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ (Oil Bath)

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างหนังปลาใบโพจุด

ทำความสะอาดปลาใบโพจุดด้วยน้ำประปาเย็น คัดไส้และขูดเกล็ดออก จากนั้นแกะหนังปลาออกจากเนื้อปลา และเอาเนื้อที่เหลือติดหนังออกด้วยมีด ล้างทำความสะอาด แล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ $2.0 \times 2.0 \text{ cm}^2$ แล้วบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ จนกว่าจะใช้งาน ไม่ควรเก็บเกิน 3 เดือน โดยทุกกระบวนการควบคุมอุณหภูมิที่ $0-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$

3.3.2 การเตรียมคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุด

3.3.2.1 การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน และการกำจัดไขมัน

ขั้นตอนการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน และการกำจัดไขมันทั้งหมดอ้างอิงจากวิธีการของ Sukkon และคณะ (2020) ทุกกระบวนการต้องควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ โดยนำหนังปลามาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M ในอัตราส่วนหนังต่อสารละลายคือ $1:15 \text{ (w/v)}$ เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออก แล้วกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 2 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง overhead stirrer แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเย็นจนพีเอชของน้ำที่ล้างเป็นกลาง จากนั้นนำหนังปลามากำจัดไขมันโดยใช้บิวทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น $10\% \text{ (v/v)}$ ในอัตราส่วนหนังต่อสารละลายเท่ากับ $1:10 \text{ (w/v)}$ กวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 6 ชั่วโมง และล้างหนังปลาด้วยน้ำเย็นที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.2 การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก

ทำการสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M ในอัตราส่วนหนึ่งต่อสารละลายเท่ากับ 1:15 (w/v) จากนั้นกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้ผ้าขาวบาง 2 ชั้น ในการกรองตะกอนออกจากส่วนที่ใส (supernatant)

3.3.2.3 การเก็บเกี่ยวคอลลาเจน

ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวคอลลาเจนทั้งหมดอ้างอิงจากวิธีการของ Truong และคณะ (2021) นำส่วนที่ใส (supernatant) จากข้อ 3.3.2.2 มาทำการตกตะกอนโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.6 M นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 °C จากนั้นนำส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M ในปริมาณน้อยที่สุด แล้วไดอะไลซ์ด้วยน้ำกลั่นนาน 12 ชั่วโมง และนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry)

3.3.3 ปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield)

คำนวณจากสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณร้อยละของผลผลิต (dry basis)} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนหลังการทำแห้ง (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักหนังปลาสดเริ่มต้นที่หักลบความชื้น (g)}}$$

การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) อ้างอิงตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963) โดยนำตัวอย่างหนังปลาใบโพจุดสด (จากข้อ 3.3.1) หนังปลาใบโพจุดที่ผ่านการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (จากข้อ 3.3.2.1) และคอลลาเจน (จากข้อ 3.3.2.3) มาวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

3.3.4 การจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจน

3.3.4.1 ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน

ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยชั่งตัวอย่าง 3 g ผสมกับสารละลาย SDS ความเข้มข้น 5% (w/v) จำนวน 27 ml นำมาปั่นผสม (Homogenise) เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปต้มที่ 85 °C เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนที่เป็นของเหลวเหนือตะกอน (Supernatant) มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี ไบยูเรต โดยเตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 15 µg/µl และนำส่วนที่เป็นของเหลว (Supernatant) มาผสมกับ SDS-PAGE sample buffer ในสัดส่วนเท่ากับ 1:1 (v/v) และต้มเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายโปรตีนมา 15 mg โหลดใส่เจล polyacrylamide จากนั้นป้อนกระแสไฟฟ้าที่มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ค่าความต่างศักย์ที่สม่ำเสมอ 15 mA/gel เข้าสู่อิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue G250 ทุกสัปดาห์ ไม่ควรทิ้งทิ้งสีอื่น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blue (R-250) 0.25% (w/v) ในเมทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) และกรดอะซิติกความเข้มข้น 5% (v/v) แล้วล้างสีพื้นหลังออกด้วยเมทานอลความเข้มข้น 30% (v/v) และกรดอะซิติกความเข้มข้น 10% (v/v)

3.3.4.3 การตรวจสอบโครงสร้างระดับทุติยภูมิของคอลลาเจน

ตรวจสอบโครงสร้างระดับทุติยภูมิของคอลลาเจนตามวิธีของ Sukkon และคณะ (2020) โดยใช้เทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ทำการวัดสเปกตรัมของคอลลาเจนโดยใช้ FTIR spectrometer ที่ความละเอียดของสเปกตรัมคือ 4 cm^{-1} และวัดค่าได้ในช่วง $4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ ที่อุณหภูมิห้อง โดยสแกนด้วยสัญญาณอัตโนมัติ 32 ครั้ง ที่ความละเอียด 4 cm^{-1} และเป็นอัตราส่วนกับการวัดสเปกตรัม ที่อุณหภูมิ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ และทำการวิเคราะห์ข้อมูลของสเปกตรัม

3.3.4.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการละลายของคอลลาเจน

ตรวจสอบผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการละลายของคอลลาเจน ตามวิธีของ Sukkon และคณะ (2020) โดยทำการละลายคอลลาเจนในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 6 mg/ml และกวนที่ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 6 mg/ml จำนวน 5 ml ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 5 ml ที่มีความเข้มข้น 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6% (w/v) ในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 M และกวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $20,000\text{ g}$ ที่อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที และนำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) และคำนวณค่า relative solubility เป็นร้อยละของปริมาณโปรตีนที่วัดได้เทียบกับปริมาณโปรตีนที่วัดได้สูงสุดที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 - 6 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\text{คำนวณค่า Relative Solubility} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่วัดได้} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนที่วัดได้สูงสุด}}$$

3.3.4.5 ผลของ pH ต่อการละลายของคอลลาเจน

ตรวจสอบผลของ pH ต่อการละลายของคอลลาเจน ตามวิธีของ Inthuserdha และคณะ (2015) โดยชั่งตัวอย่างคอลลาเจน 0.24 g เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 80 ml กวนที่อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งละลายหมด จากนั้นดูดสารละลายคอลลาเจนปริมาตร 8 ml ใส่หลอดเหวี่ยงขนาด 50 ml จำนวน 10 หลอด ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 6 M หรือกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 M ให้ได้ค่า pH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น ที่มีค่า pH ตามที่ปรับไว้แล้ว เหวี่ยงที่ $10,000\text{ g}$ ที่อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใส

มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี ของ Lowry และคณะ (1951) และ คำนวณค่า relative solubility เป็นร้อยละของปริมาณโปรตีนที่วัดได้เทียบกับปริมาณโปรตีนที่วัดได้สูงสุดที่ละลายในช่วง pH 1 – 10 ดังนี้

$$\text{คำนวณค่า Relative Solubility} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่วัดได้} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนที่วัดได้สูงสุด}}$$

3.3.5 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 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ปริมาณร้อยละของผลผลิตคอลลาเจน (% yield)

จากการทดลองการสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาใบโพจุด พบว่าได้ปริมาณร้อยละผลผลิตคอลลาเจนคิดเป็น 25.44% (dry weight) อย่างไรก็ตามปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาใบโพจุดยังมีปริมาณน้อยกว่าคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลาแพนกาเซียสดอรี (73.40%) (Divya และคณะ, 2018), ปลากระพงแดง (41.19%) (Zaelani และคณะ, 2019) และปลาสด (34.65%) (Sukkon และคณะ, 2020) ปริมาณผลผลิตที่ได้แตกต่างกันอาจขึ้นอยู่กับชนิด สภาพแวดล้อม และอุณหภูมิของร่างกายปลา (Duan และคณะ, 2009)

การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของหนังปลาใบโพจุด หนังที่กำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน และคอลลาเจน ตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963) แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าหนังปลาใบโพจุดสดมีปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน 20.67 ± 0.25 mg/g sample เมื่อผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่ามีปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน 22.28 ± 0.20 mg/g sample และหลังจากผ่านกระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก พบว่ามีปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน 91.60 ± 0.26 mg/g sample ซึ่งมีปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kittiphattanabawon (2005) ที่ได้ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังและกระดูกจากปลากระพงข้างเหลือง (Bigeye snapper) แสดงให้เห็นถึงความบริสุทธิ์ของคอลลาเจนที่สกัดได้ เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนมีขั้นตอนในการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออก ส่งผลให้ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่วิเคราะห์ได้หลังจากที่สกัดเป็นคอลลาเจนแล้วนั้นมีปริมาณสูงกว่าหนังปลาสด

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

ตัวอย่าง	ไฮดรอกซีโพรลีน (mg/g sample)
หนังปลาใบโพจุดสด	20.67 ± 0.25
หนังปลาใบโพจุดที่กำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน	22.28 ± 0.20
คอลลาเจน	91.60 ± 0.26

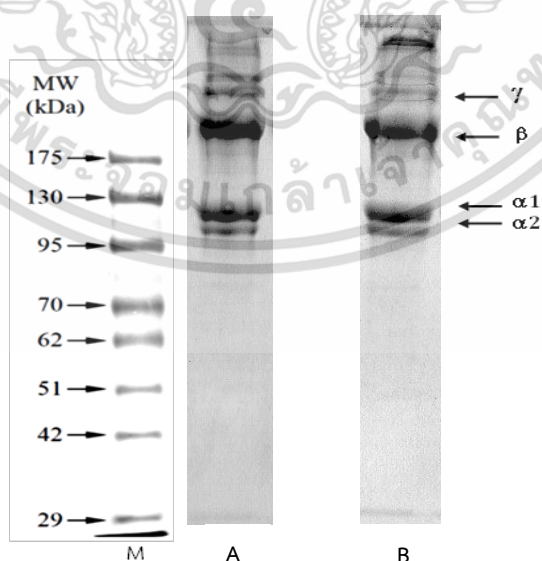
*ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) โดยน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจน

4.2.1 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน

รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาใบโพจุดแสดงดังภาพที่ 4.1 จากภาพประกอบไปด้วยสายโซ่แอลฟา 2 สาย ($\alpha 1$ และ $\alpha 2$) สายเบต้า (β) และส่วนประกอบแกมมา (γ) ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานของ Giraud-Guille และคณะ (2000) ที่กล่าวว่าคอลลาเจนจากหนังปลาส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยสายโซ่ แอลฟา 2 สาย ($\alpha 1$ และ $\alpha 2$) สายโซ่เบต้า (β) และส่วนประกอบแกมมา (γ) อีกทั้งยังมีรูปแบบโปรตีนคล้ายกับคอลลาเจนจากหนังลูกวัว โดยผลการทดลองได้แสดงถึง อัตราส่วนของความเข้มข้นของสาย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ อยู่ที่ประมาณ 2:1 ซึ่งตรงกับคุณลักษณะของคอลลาเจน type I (Ali และคณะ, 2018) ซึ่งเป็นคอลลาเจนหลักที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Muyonga และคณะ, 2004) นอกจากนี้รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาใบโพจุดยังคล้ายคลึงกับคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาแซลมอนซ็อกอาย (Nilsuwan และคณะ, 2022), ปลากทราย (Petcharat และคณะ, 2020) และปลาคอด (Alves และคณะ, 2017) โดยปกติคอลลาเจน type I จะมีองค์ประกอบของ โปรตีนอยู่ 2 รูปแบบคือ ($[\alpha 1]_2 \alpha 2$) และ ($\alpha 1\alpha 2\alpha 3$) ซึ่งจะไม่สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนของ $\alpha 3$ ได้ เนื่องจากตำแหน่งของ $\alpha 3$ จะอยู่ในตำแหน่งเดียวกับ $\alpha 1$ (Kimura, 1992) จากการศึกษาภายใต้สภาวะ reducing และ non-reducing พบว่ารูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนทั้ง 2 สภาวะไม่มีความแตกต่างกันจึงคาดได้ว่าคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุดไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ จึงกล่าวได้ว่าสามารถจำแนกรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาใบโพจุดเป็นคอลลาเจน type I ที่ไม่พบพันธะไดซัลไฟด์



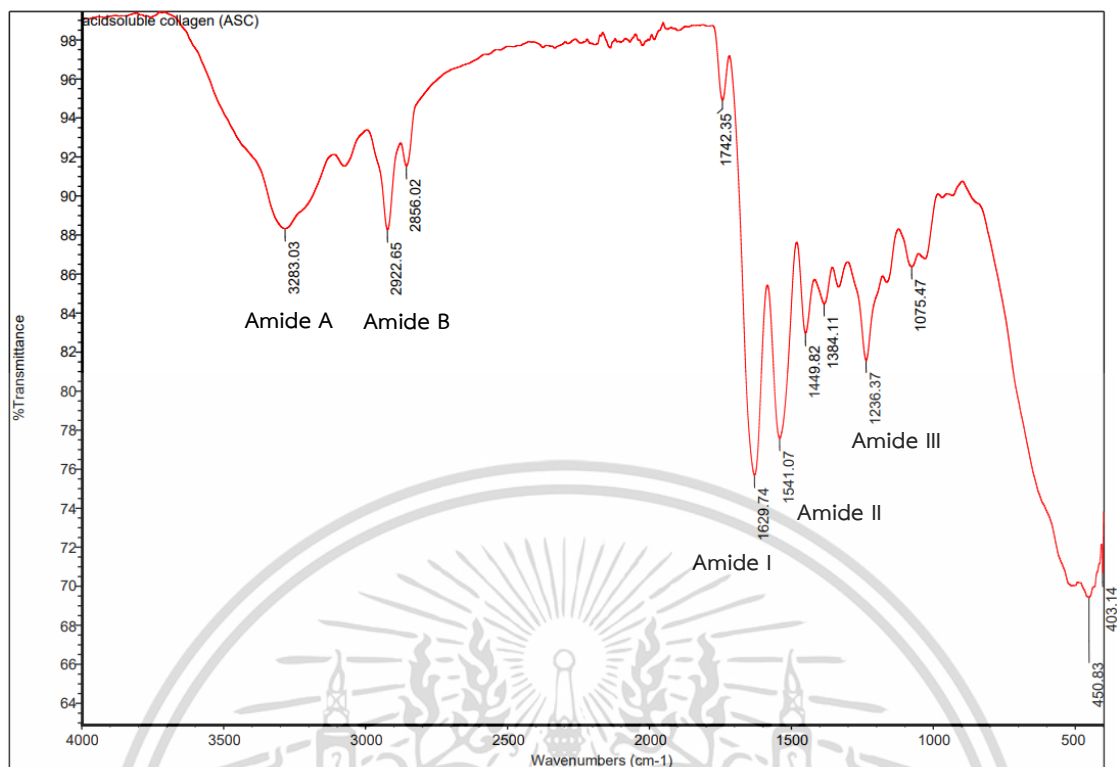
ภาพที่ 4.1 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาใบโพจุด (*Drepane punctata*) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ภายใต้สภาวะ non-reducing (A) reducing (B) และแถบโปรตีนมาตรฐาน (M) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแบบส่งเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การตรวจสอบโครงสร้างระดับทุติยภูมิของคอลลาเจน (FTIR)

จากการตรวจสอบพันธะที่เป็นองค์ประกอบของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) วัดค่าในช่วง $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ที่อุณหภูมิห้อง แสดงผลการทดสอบดังภาพที่ 4.2 พบว่าสเปกตรัม FTIR ของคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุดที่สกัดด้วยกรดอะซิติก ปรากฏแถบ amide A ที่เลขคลื่น 3283.03 cm^{-1} ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง N-H หากว่าตำแหน่งนี้ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจน (free N-H) จะปรากฏแถบการดูดซับในช่วง $3,400-3,440\text{ cm}^{-1}$ แต่ถ้าตำแหน่ง N-H เกิดพันธะไฮโดรเจนจะปรากฏแถบการดูดซับที่เลขคลื่นต่ำลง ที่ค่าประมาณ $3,300\text{ cm}^{-1}$ (Doyle และคณะ, 1975) นอกจากนี้ยังพบแถบ Amide B ที่เลขคลื่น 2922.65 cm^{-1} ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยึดตัวแบบไม่สมมาตรของ CH₂ (Muyonga และคณะ, 2004)

ตำแหน่ง Amide I พบที่เลขคลื่น 1629.74 cm^{-1} มาจากการสั่นสะเทือนของการยึดตัวของหมู่คาร์บอนิลในเปปไทด์ (Payne และ Veis, 1988) ซึ่งเกี่ยวข้องข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (Surewicz และ Mantsch, 1988) แถบ Amide II พบที่เลขคลื่น 1541.07 cm^{-1} ซึ่งเกี่ยวข้องข้องกับการงอที่ตำแหน่ง N-H และการยึดตัวของ C-N (Gharagheshlagh และคณะ, 2019) สำหรับแถบ Amide III พบที่เลขคลื่น 1236.37 cm^{-1} เกี่ยวข้องข้องกับการยึดตัวของ C-N และ N-H ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน (Muyonga และคณะ, 2004) ดังนั้นคอลลาเจนจากปลาใบโพจุดในการทดลองนี้มีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบเกลียวสามสาย

นอกจากนี้แถบการดูดซับ Amide A, Amide B, Amide I, Amide II และ Amide III ของคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุดในการทดลองนี้มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลานิล (Inthuserdha และคณะ, 2015), ปลาหมูสี (Firdayanti และคณะ, 2023), ปลาตาหวานจุด (oslan และคณะ, 2022), ปลาปากคม (jaziri และคณะ, 2022) และปลาจวด (Li และคณะ, 2018)

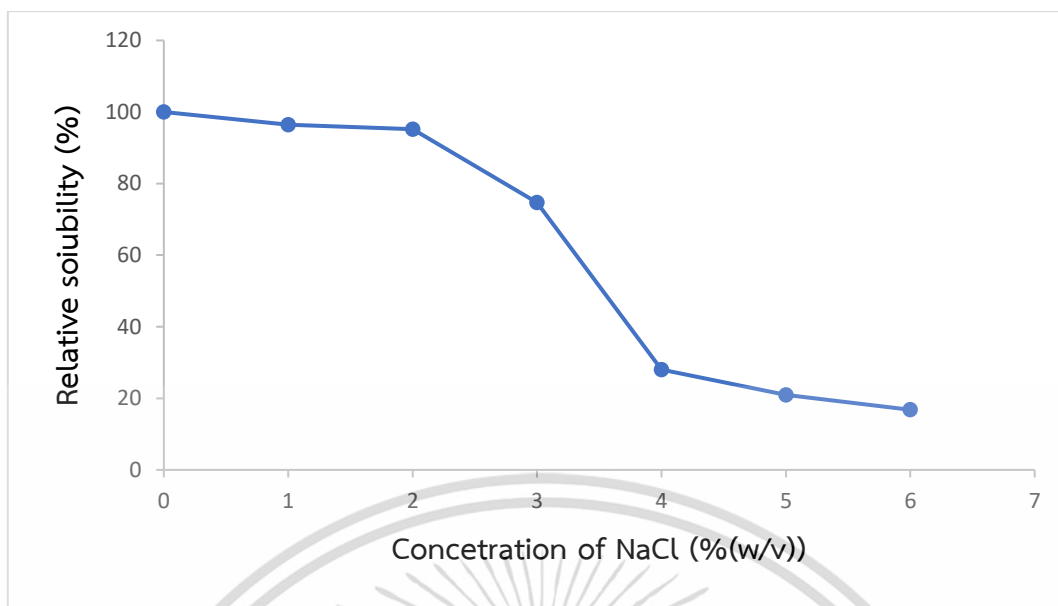


ภาพที่ 4.2 Fourier transform infrared spectrum (FTIR) ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาใบโพจุต

4.2.3 การละลายของคอลลาเจน (Collagen solubility)

ผลกระทบของปริมาณเกลือต่อการละลายของคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุตที่สกัดด้วยกรดอะซิติก แสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่าคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุตที่สกัดได้มีรูปแบบการละลายในสารละลายเกลือ ดังนี้ คอลลาเจนทั้งหมดสามารถละลายได้ดีที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำกว่า 2% (w/v) จากนั้น การละลายของคอลลาเจนจะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 4% (w/v) และการละลายของคอลลาเจนจะคงที่ในระดับต่ำ ใกล้เคียงกับการละลายของคอลลาเจนจากปลาตาหวานจุด (oslan และคณะ, 2022), ปลาปากคม (jaziri และคณะ, 2022), ปลาจวด (Li และคณะ, 2018) และปลาโอแถบ (Chanmangkang และคณะ, 2022) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของเกลือในสารละลายเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า ionic strength เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้สายโปรตีนทำปฏิกิริยาไฮโดรโฟบิกระหว่างกันมากขึ้น โปรตีนก็จะจับตัวเป็นก้อนจนกระทั่งตกตะกอนแยกตัวออกมาจากสารละลาย ซึ่งเราเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า salting out โดย (Vojdani, 1996)

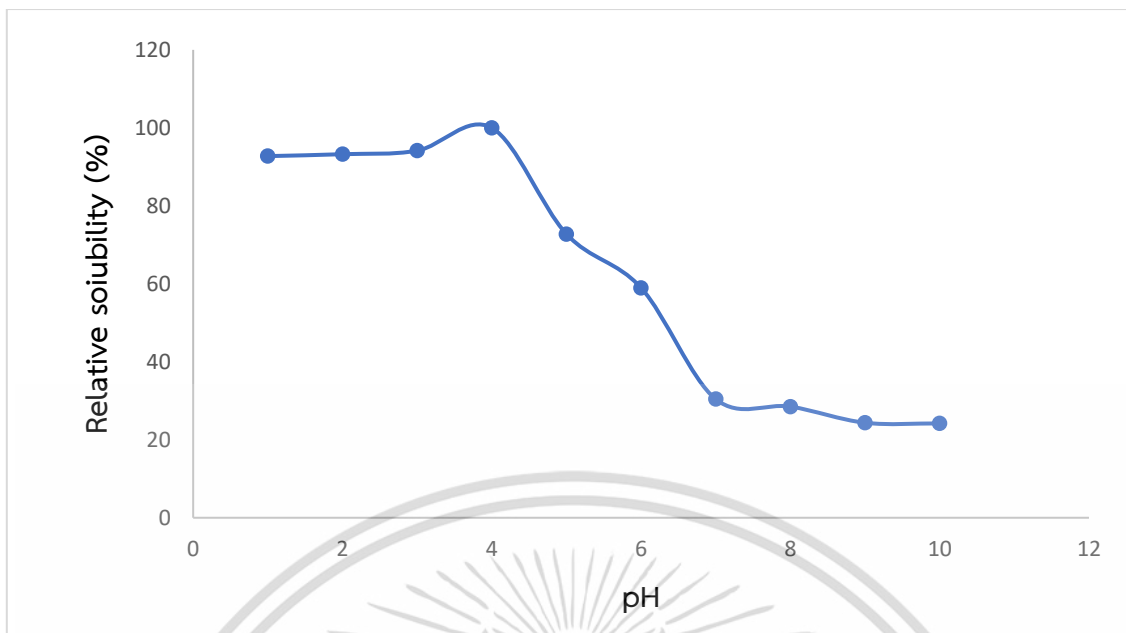
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 การละลายสัมพัทธ์ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาใบโพจุดในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน

ผลของค่า pH ต่อความสามารถในการละลายของคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุดที่สกัดด้วยกรดอะซิติก แสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้มีรูปแบบการละลายที่สามารถละลายได้สูง ในสภาวะที่เป็นกรด โดยในช่วง pH ตั้งแต่ 1-4 มีค่าการละลายสัมพัทธ์ของคอลลาเจน มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เช่นเดียวกับ ปลิงทะเล (Li และคณะ, 2020) ปลากระต่าย (Tan และคณะ, 2018) และปลาอีสก (Ali และคณะ, 2018) ที่ละลายได้สูงในช่วงค่า pH ที่เป็นกรดมาก จากนั้นการละลายของคอลลาเจนจะลดต่ำลงมาจนกระทั่งลดลงต่ำสุดที่ pH ประมาณ 7 เนื่องจากค่า pH อยู่ในช่วง pI ของคอลลาเจน กล่าวคือในช่วง pI ค่าประจุมวลรวมของโมเลกุลโปรตีนจะเท่ากับศูนย์ ทำให้โมเลกุลโปรตีนไม่เกิดแรงผลักระหว่างกัน ดังนั้นสายโซ่โปรตีนจึงสามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรโฟบิกระหว่างกัน เกิดการจับตัวกันเป็นก้อนและตกตะกอนออกมา ค่าการละลายของโปรตีนจึงลดลง ในทางตรงกันข้าม ที่ pH ต่ำกว่าหรือสูงกว่าค่า pI จะทำให้ค่าประจุมวลรวมของโมเลกุลโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อสายโซ่โปรตีนมีประจุมวลรวมมากขึ้นทำให้เกิดแรงผลักระหว่างสายโซ่โปรตีน จึงทำให้การละลายของโปรตีนเพิ่มมากขึ้น โดยมีการรายงานว่าค่า isoelectric point ของคอลลาเจนอยู่ในช่วง pH 6–9 (Foegeding และคณะ, 1996) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นช่วงของการละลายของคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุดที่ลดต่ำลงในช่วง pH 7-10 ซึ่งสอดคล้องกันกับข้อมูลที่ได้รายงานไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 การละลายสัมพัทธ์ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (ASC) จากหนังปลาไบโพจูดในสถานะที่มี pH แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษาการสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาใบโพจุด (*Drepane punctata*) คอลลาเจนที่ได้มีปริมาณร้อยละผลผลิต 25.44% (dry weight) อย่างไรก็ตามคอลลาเจนที่ได้ถือว่ามีควมบริสุทธิ์ เนื่องจากมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของคอลลาเจนเพิ่มขึ้นจากหนังปลาสด และจากการจำแนกคุณลักษณะของคอลลาเจนโดย SDS-PAGE พบว่าเป็นคอลลาเจน type I ซึ่งคล้ายกับคอลลาเจนที่พบในหนังปลาส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการละลายของ ASC ขึ้นอยู่กับ pH และความเข้มข้นของ NaCl ดังนั้นหนังปลาใบโพจุดจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการสกัดคอลลาเจน แทนการสกัดคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีข้อจำกัดด้านโรคระบาดและศาสนา คอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุดยังสามารถนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมด้านผลิตภัณฑ์อาหาร ด้านเครื่องสำอาง และด้านเภสัชกรรมต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองครั้งต่อไปควรมีการปรับเปลี่ยนวิธีการสกัด เช่น การใช้เปปซิน หรือการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการช่วยสกัด เพื่อเพิ่มปริมาณร้อยละผลผลิตของคอลลาเจน
2. ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 4°C ในทุกขั้นตอนตั้งแต่การเตรียมตัวอย่างจนถึงขั้นตอนการเก็บเกี่ยวคอลลาเจน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- ด้านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดสมุทรสาคร. 2563. คู่มือการจำแนกชนิดสัตว์น้ำที่นำเข้ามาผ่านทางด่านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดสมุทรสาคร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20200820123516_1_file.pdf
 25 มีนาคม 2566.
- นันทพร อัครนิจ. 2550. การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสิ่กูดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ. 2563. การสกัดคอลลาเจนจากเศษเหลือของการแปรรูปสัตว์น้ำและการนำไปใช้ประโยชน์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20200710091001_1_file.pdf
 11 พฤศจิกายน 2565.
- พญ.อารยะ มานะผจญ. 2565. เรื่องของคอลลาเจนข้อเท็จจริงที่ควรรู้. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<https://www.siphhospital.com/th/news/article/share/375#:~:text=คอลลาเจนสามารถ,ซ์คอลลาเจน>) 25 มีนาคม 2566.
- มาลัยวรรณ อารยะสกุล และ วรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ. 2549. เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 5. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ
- ลันตาปลาไทย. 2562. ปลาใบปอ (*Spotted sicklefish*). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<https://www.facebook.com/lantaplathai/posts/2344139962510040/>
 25 มีนาคม 2566.
- สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร रिमพนิชยกิจ. 2551. ซีวโมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัท วี.พริ้นท์ (1991) จำกัด. กรุงเทพฯ
- อาหารทะเลสด. 2566. ปลาใบปอ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<https://www.facebook.com/groups/960362684518139/search/?q=%E0%B9%83%E0%B8%9A%E0%B8%9B%E0%B8%AD> 25 มีนาคม 2566.
- Abdelaal, H., Mohamed, H., Salah, S. and Elhosany, R. 2021. Characteristics of acid soluble collagen from catfish (*Clarias Lazera*) skin. Food Biotechnology. 403-410.
- Adyaniazizah. 2020. Connective tissue (Collagen). [Online]. Available
https://www.tes.com/lessons/jezmMDoMaDP_kw/connective-tissue-collagen.
 14 November 2022.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ahmad, M., Benlakul, 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.
- Ali, A.M.M., Benjakul, S., Prodpran, T. and Kishimura, H. Extraction and characterisation of collagen from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*), a processing by-product. Waste Biomass Valoriz 9:783–791 (2018).
- Bailey, A.J. and Light, N.D. 1989. Connective tissue in meat and meat products. New York: Elsevier Applied Science.
- 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.
- Chanmangkang S., Wangtueai S., Pansawat N., Tepwong P., Panya A. and Maneerote J. 2022. Characteristics and Properties of Acid- and Pepsin-Solubilized Collagens from the Tail Tendon of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*). Polymers. 14, 5329.
- Chen, J., Li, J., Li, Z., Yi, R., Shi, S., Wu, K., Li, Y. and Wu, S. 2019. Physicochemical and functional properties of type I collagens in red stingray (*Dasyatis akajei*) skin. Marine drugs. 17: 558.
- Creighton, T.E. 1993. Protein: Structure and molecular properties. New York: W.H. Freeman Company.
- Divya K.V., Sreerexha P.R., Tejpal C.S., Asha K.K., Mathew S., Ravishankar C.N. and Anandan R. 2018. Extraction and characterization of acid soluble collagen (ASC) from airbladder of striped cat fish (*Pangasius hypophthalmus*). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 6(4): 310-318.
- Firdayanti W., Trilaksani W. and Pureaningsih S. 2022. Valorization of emperor fish (*Lethrinus lentjan*) skin for collagen isolation: effect of acetic acid ratio and extraction time. Earth and Environmental Science. 1137 (2023) 012047.
- Foegeding, E.A., Lanier, T.C. and Hultin, H.O. 1996. Characteristics of edible muscle tissues. 879-942. In Food Chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker.
- Ge, B., Hou, C., Bao, B., Pan, Z., Val, J.E.M.S., Elango, J., and Wu, W. 2022. Comparison of physicochemical and structural properties of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from blacktip reef shark skin. marine drugs. 20, 376.
- Gelse, K. 2003. Collagens-structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews, 55(12), 1531-1546.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Giraud-Guille, M. M., L. Besseau, C. Chopin, P. Durand and D. Herbage. 2000. Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials*. 21: 899-906.
- Global Market Estimates. 2022. Global Collagen Market Size. [Online]. Available <https://www.globalmarketestimates.com/market-report/collagen-market-3918> 25 March 2023.
- Gomez-Guillen, M.C. and Montero, P. 2001. Extraction of gelatin from megrim (*Lepidorhombus boscii*) skins with several organic acids. *Journal of Food Science*. 66: 213–216.
- Inthuserdha P. and Chiradetprapai N. 2015. Extraction of acid-soluble collagen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skins. *Fishery technological development division*. 54-0805-54058.
- Jaziri A.A., Shapawi R., Mokhtar R.A.M., Noordin W.N.Md. and Huda N. 2022. Physicochemical and Microstructural Analyses of Pepsin-Soluble Collagens Derived from Lizardfish (*Saurida tumbil* Bloch, 1795) Skin, Bone and Scales. *Gels*. 8, 471.
- Jillian Kubala. 2022. What is collagen, and what is it good for?. [Online]. Available <https://www.healthline.com/nutrition/collagen>. 11 November 2022.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Tanaka, M. 2005. Isolation and characterisation of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus marcracanthus*) skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1203–1210.
- Kim, H.J., Jee, S.J., Yoon, M.S., Youn, M.H., Kang, K.T., Lee, D.H., Heu, M.S. and Kim, J.S. 2009. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from rockfish (*Sebastes schlegelii*) skin. *Journal of fisheries science and technology*. 12(1), 6-15.
- Kimura, S. 1992. Wide distribution of the skin type I collagen $\alpha 3$ chain in bony fish. *Laboratory of Food Biochemistry*. 102: 255-260.
- Kumar, N.S.S., and Nazeer, R.A. 2011. Characterization of acid and pepsin soluble collagen from the skin of horse mackerels (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *International Journal of Food Properties*. 16:613–621.
- Li, P.H., Lu, W.C., Chan, Y.J., Ko, W.C., Jung, C.C., Huynh, D.T.L., et al. (2020). Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics. *Aquaculture*, 515, Article 734590.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Li L.Y., Zhao Y.Q., He Y., Chi C.Y. and Wang B. 2018. Physicochemical and Antioxidant Properties of Acid- and Pepsin-Soluble Collagens from the Scales of Miiuy Croaker (*Miichthys Miiuy*). *Marine drugs*. 16, 394.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4. New York: W.H.Freeman.
- Muyongaa, J.H. Coleb, C.G.B. and Duodub, K.G. 2004. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 85: 81-89.
- Nagai, T., Araki, Y. and Suzuki, N. 2002. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry*. 78: 173-177.
- Nagai, T., Suzki, N., Tanoue, Y., Kai, N. and Nagashima, T. 2010. Characterization of acid-soluble collagen from skins of surf smelt (*Hypomesus pretiosus japonicus* Brevoort). *Food and Nutrition Sciences*. 1, 59-66.
- Nilsuwan, K., Fusang, K., Pripatnanont, P., Benjakul, S. 2022. Properties and Characteristics of Acid-Soluble Collagen from Salmon Skin Defatted with the Aid of Ultrasonication. *Fishes* 2022, 7, 51.
- Ong, T.Y., Shaik, M.I. and Sarbon, N.M. 2021. Isolation and characterization of acid and pepsin soluble collagen extracted from sharpnose stingray (*Dasyatis zugei*) skin. *Food research*. 5(3): 214-224.
- Oslan, S.N.H., Shapawi, R., Mokhtar, R.A.M., Noordin, W.N.M. and Huda, N. 2022. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of purple-spotted bigeye snapper. *Gels*. 8, 665.
- Petcharat, T., Benjakul, S., Karnjanapratum, S. and Nalinanon, S. 2020. Ultrasound-assisted extraction of collagen from clown featherback (*Chitala ornata*) skin: yield and molecular characteristics. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 101: 648-658.
- Shen, X.R. Kurihara, H. and Takahashi, K. 2007. Characterisation of molecular species of collagen in scallop mantle. *Food Chemistry*. 102: 1187-1191.
- Shoulders, D and Raines, T. 2009. Collagen structure and stability. *Ann. Rev. Biochem*. 78: 929-958.
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S. and Kishimura, H. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*. 124:97-105.

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับครูผู้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Srinivasan, S. and Durairaj, B. 2021. Collagen isolation and characterization from *Sardinella longiceps*. Journal of advanced veterinary and animal research. 8(4): 679–686.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometerial Approach. 2nd ed. McGraw-Hill. New York. USA.
- Sukkon, P., Ail, A.M.M., Nalinanon, S., Kishimura, H. and Takeungwontrakul, S. 2020. Characterization of acid soluble collagen from the skin of snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*). Carpathian journal of food science and technology. 12(2): 75-8.
- Tan, Y., and Chang, S.K.C. (2018). Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. Food Chemistry, 242, 147–155.
- Tidu, A., Schanne-Klein, M.-C. and Borderie, V.M. 2020. Development, structure, and bioengineering of the human corneal stroma: A review of collagen-based implants. Experimental Eye Research. 200: 108256.
- Truong, T.M.T., Nguyen, V.M., Tran, T.T. and Le, T.M.T. 2021. Characterization of acid-soluble collagen from food processing by-products of snakehead fish (*Channa striata*). Processes. 9: 1188.
- Veeruraj, A., Arumugam, M. and Balasubramanian, T. 2013. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). Process Biochemistry. 48: 1592–1602.
- Vojdani, F. 1996. Solubility. In: G. M. Hall (Ed.), Methods of testing protein functionality. Great Britain: St. Edmundsbury Press. p. 11-60.
- Ward, A.G. and Courts, A. 1977. The science and technology of gelatin. London: Academic Press.
- Wang S.S., Yu Y., Sun Y., Liu N. and Zhou D.Q. 2019. Comparison of physicochemical characteristics and fibril formation ability of collagens extracted from the skin of farmed river puffer (*Takifugu obscurus*) and tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Marine drugs. 17, 462.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zaelani B., Safithri M., Tarman K., Setyaningsih I. and Meydia. 2018. Collagen isolation with acid soluble method from the skin of Red Snapper (*lutjanus sp.*). Earth and Environmental Science. 241 (2019) 012033.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน ตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963)

ก.1 สารเคมี

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

ก.2 การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5-1 กรัม ใส่หลอดทดลองแบบฝาเกลียว เติมไฮโดรเจนคลอไรด์ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียว
2. นำไปไฮโดรไลซ์ ที่ 110°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ใน oil bath จนได้สารละลายใส ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Activated carbon (ตักปลายช้อน) และทำการ vortex
3. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ใน Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และล้างด้วยน้ำกลั่น
4. ทำให้เป็นกลางด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ จนได้ pH ประมาณ 6.0-6.8 และปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ก.3 การวิเคราะห์

5. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแบบฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร
6. ปิเปต Iso-propanol 0.2 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน
7. ปิเปตสารละลายออกซิแดนซ์ 0.1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 4 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
8. ปิเปตสารละลาย Ehrlich's reagent 1.3 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ใน Water bath
9. ทำให้เย็นโดยเปิดน้ำไหลผ่าน 2-3 นาที ทำให้เจือจางด้วย Iso-propanol 3.3 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 558 นอร์มอล ภายใน 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ก 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีน

หลอดทดลอง ที่	น้ำ (ไมโครลิตร)	ไฮดรอกซีโพรลีน 400 ppm (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของ ไฮดรอกซีโพรลีน (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

ก.4 การคำนวณ

ใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีน

เช่น $Y = 0.0125x$, $R^2 = 0.9982$

ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสง/0.0125

= x มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายตัวอย่างปริมาณ 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน x มิลลิกรัมต่อลิตร

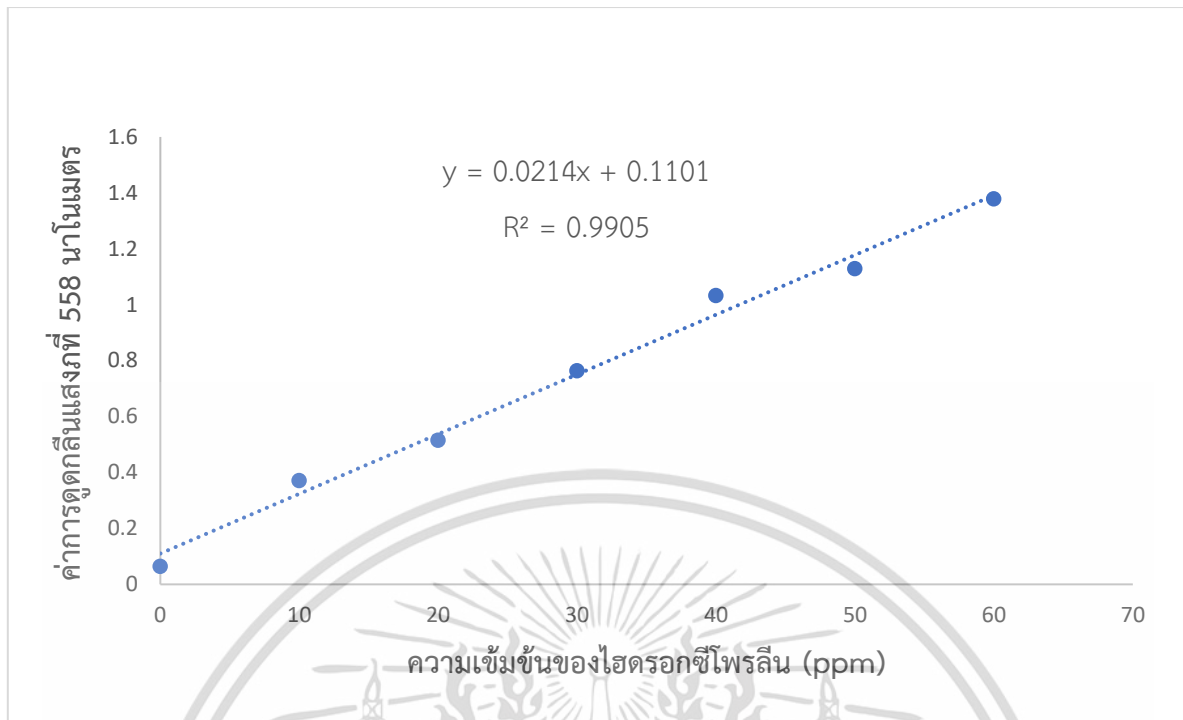
ถ้าสารละลายตัวอย่างปริมาณ 100 มิลลิลิตร มีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน $\frac{x}{10}$ มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายจำนวน 100 มิลลิลิตร มาจากตัวอย่างจำนวน A กรัม

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวก ก 1 กราฟมาตรฐานไฮดรอกซีเพอร์ออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจน ตามวิธีของ Laemli (1970)

ข.1 สารเคมี

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

2. Fixing solution ที่มีส่วนผสมของ
 - Methanol ปริมาณ 500 มิลลิลิตร
 - กรด acetic ปริมาณ 100 มิลลิลิตร
 - น้ำกลั่น ปริมาณ 400 มิลลิลิตร

แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

3. Staining solution
 - Coomassie brilliant blue R250 จำนวน 0.5 กรัม
 - Methanol ปริมาณ 150 มิลลิลิตร
 - กรด acetic ปริมาณ 50 มิลลิลิตร

แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

4. Sample buffer (SDS 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
 - β -mercaptoethanol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร
 - โบรโมฟีนอลบลู จำนวน 0.03 กรัม

แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร

5. 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
- โบรโมฟีนอลบลู จำนวน 0.03 กรัม
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากมีเหตุตบแต่งเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร

6. สารที่ใช้ในการเตรียมเจล

- Acrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 30
- Tris ความเข้มข้น 1.5 M pH 8.8
- Tris ความเข้มข้น 0.5 M pH 6.8
- น้ำ DI
- SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10
- APS ความเข้มข้นร้อยละ 10
- TEMED

ข.2 อุปกรณ์

1. slab gel electrophoresis apparatus
2. power supply

ข.3 การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างคอลลาเจน 18 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่นร้อนอุณหภูมิ 60°C ปริมาณ 3 มิลลิลิตร นาน 30 นาที
2. เขย่าเบา ๆ
3. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
4. นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี biuret ให้ได้สารละลายคอลลาเจนเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5. นำสารละลายคอลลาเจนปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย sample buffer ในสภาพ reducing และ non-reducing ปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า -18°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.4 การเตรียมเจล

Reagents	Running gel ร้อยละ 7.5	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

ข.5 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 4 ลงไป
2. เติมสารละลายคอลลาเจนและโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน
3. เติม electrode buffer ลงใน chamber
4. เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 20 mA/gel ประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีน้ำเงินของโบรมิฟีนอลบลูเคลื่อนลงไปที่ขอบล่างของเจล
5. ปิดกระแสไฟ และนำแผ่นเจลแช่ใน fixing solution แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า 10 นาที
6. เท fixing solution ออกแล้วย้อมสีโดยใช้ staining solution วางบนเครื่องเขย่า แล้วทิ้งไว้ข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

ค.1 สารเคมี

1. Sodium carbonate (Na_2CO)
2. Sodium hydroxide (NaOH)
3. Copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
4. Sodium potassium tartrate ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)
5. Bovine serum albumin (BSA)

ค.2 อุปกรณ์

1. Spectrophotometer cuvette
2. Vortex mixer
3. ปีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร 3 ใบ
4. ปีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร 2 ใบ
5. ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร 2 ใบ
6. กระบอกรวบรวม ขนาด 100 มิลลิลิตร 1 อัน
7. แท่งแก้วสำหรับคนสาร 2 อัน
8. กรวยแก้ว 1 อัน
9. ขวดสีชา ขนาด 500 มิลลิลิตร 2 ใบ
10. ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร 5 อัน
11. ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร 5 อัน
12. หลอดทดลอง ขนาด 15 x 200 มิลลิลิตร 30 หลอด

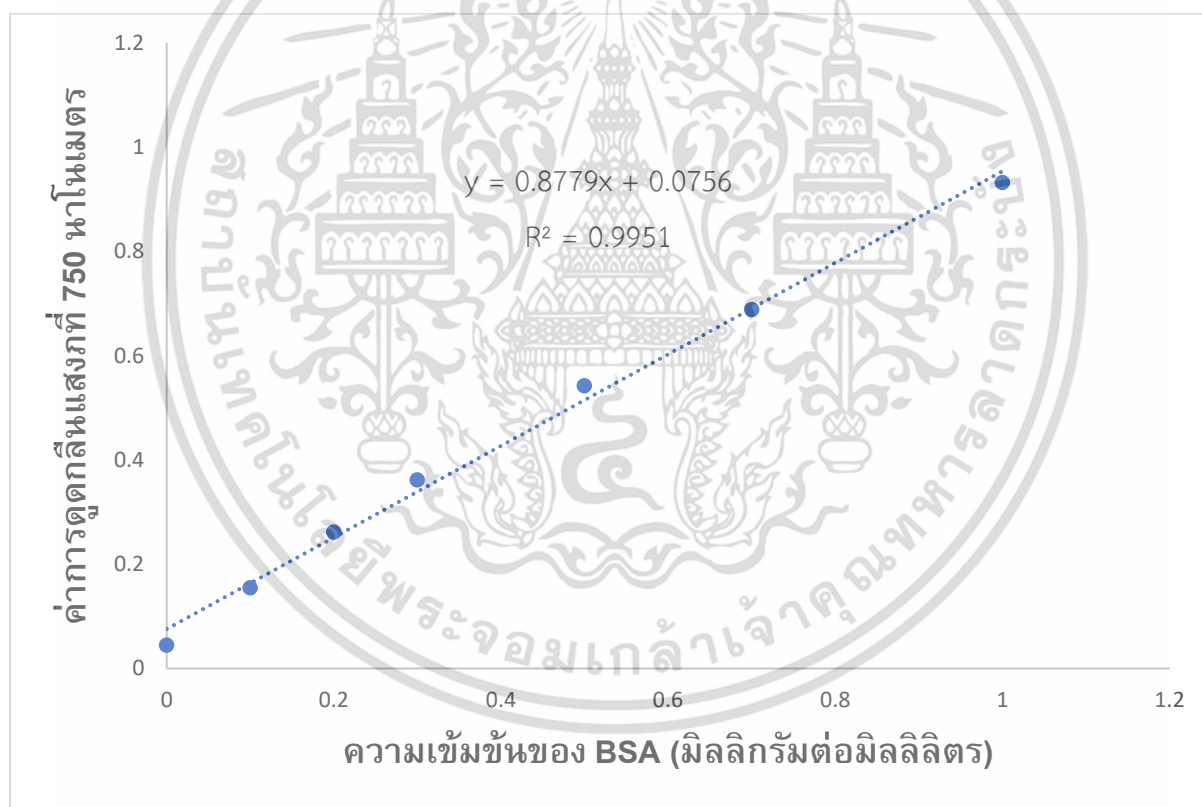
ค.3 การวิเคราะห์

1. เจือจางตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
2. ปิเปตตัวอย่างเจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม alkali solution 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร (ขณะที่เติมให้เขย่าหลอดด้วย) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยใช้กราฟ

มาตรฐานของ BSA
เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.4 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. เตรียมหลอดทดลอง 6 หลอด ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมได้ปริมาตร 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองใช้น้ำกลั่นเป็น blank
2. เติมน้ำกลั่น โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 1 มิลลิลิตร จะได้ปริมาณโปรตีนแต่ละหลอดเป็น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัม ตามลำดับ
3. เติมสารละลาย alkaline solution หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
4. เติม Folin-Ciocalteu reagent หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ในขณะที่เติมให้เขย่าหลอดด้วย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD_{750}) กับ ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม) ในแต่ละหลอด



ภาพภาคผนวก ค 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง (750 นาโนเมตร) กับความเข้มข้นของ BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

รูปภาพประกอบวิธีการทดลอง

ง.1 ขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาใบโพจุด



รูปที่ ง.1 การแลหนังปลา (1) และขูดเนื้อออก (2)

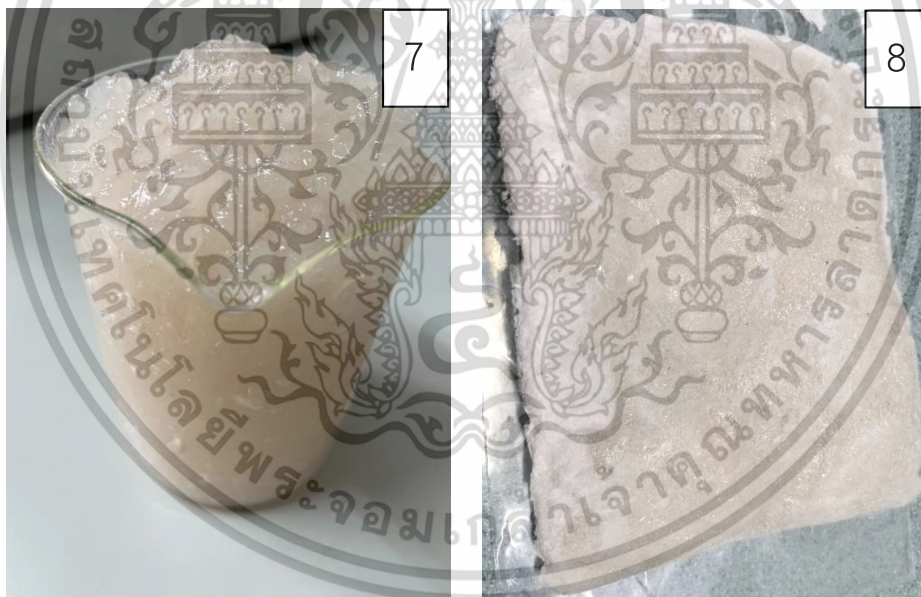


รูปที่ ง.2 การตัดหนังปลาให้มีขนาด $2.0 \times 2.0 \text{ cm}^2$ (3) และหนังปลาที่ผ่านการแช่สารละลาย NaOH (4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๓.3 หนึ่งปลาที่ผ่านการแช่สารละลาย butyl alcohol (5) และการกรองหนึ่งปลาที่ผ่านการแช่สารละลาย acetic acid ด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น (6)



รูปที่ ๓.4 คอลลาเจนหลังทำการ dialysis (7) และคอลลาเจนหลังทำการ freeze dry (8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นายญาณวุฒิ เมย์กำเน็ด
 วัน เดือน ปีเกิด 25 กรกฎาคม 2543
 ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ.2565 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ-นามสกุล นางสาวสาวฟ้า เฉลยสมัย
 วัน เดือน ปีเกิด 19 มิถุนายน 2543
 ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ.2565 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ-นามสกุล นางสาวสุภาภรณ์ เมฆนามนิตย์
 วัน เดือน ปีเกิด 4 มกราคม 2544
 ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ.2565 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้