การศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง

STUDY ON THE OPTIMUN CONDITIONS OF COLLAGEN EXTRACTION FROM PORCINE SKIN USING PERIODIC PRESSURIRED TECHNIQUE

นางสาวพรปิยา สารวิทย์ รหัส 53364192

นายพีรณัฐ อินทร์แก้ว รหัส 53364802

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2556

ห้องสมุดคณะวิศวกรรมศาสตร์
วันที่รับ 12 ม.ค. 2558
เลขทะเบียน 1089765 4
เลขเรียกหนังสือ ม.ร.
มหาวิทยาลัยนเรศวร ฟ 245 ร 2556

ใบรับรองปริญญานิพนธ์

ชื่อหัวข้อโครงงาน การศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง

ผู้ดำเนินโครงงาน นางสาวพรปิยา สารวิทย์ รหัส 53364192

นายพีรณัฐ อินทร์แก้ว รหัส 53364802

ที่ปรึกษาโครงงาน ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ภาควิชา วิศวกรรมอุตสาหการ

ปีการศึกษา 2556

.....

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

.....ที่ปรึกษาโครงงาน
(ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์)

.....กรรมการ
(ดร.นพวรรณ โม้ทอง)

.....กรรมการ
(ดร.ภมรรัตน์ จันธรรม)

.....กรรมการ
(ดร.นิคม กลมเกลี้ยง)

.....กรรมการ
(อาจารย์อาภาภรณ์ จันทร์ปิรักษ์)

ชื่อหัวข้อโครงงาน	การศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง		
ผู้ดำเนินโครงงาน	นางสาวพรปิยา	สารวิทย์	รหัส 53364192
	นายพีรณัฐ	อินทร์แก้ว	รหัส 53364802
ที่ปรึกษาโครงงาน	ดร.อิศราวุธ	ประเสริฐสังข์	
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี		
ภาควิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ		
ปีการศึกษา	2556		

.....

บทคัดย่อ

ในโครงงานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกและเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง โดยตัวแปรที่ศึกษา คือ จำนวนรอบของกระบวนการอัดคลายแรงดัน ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดและแรงดันที่ใช้ในการสกัด โดยใช้กรดอะซิตริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ จากผลการวัดปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ พบว่าการประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดัน ส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นทุกช่วงเวลาของการสกัดคอลลาเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดคอลลาเจนแบบการปั่นกวน เนื่องจากการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันสามารถช่วยทำให้การแทรกซึมของเอนไซม์เข้าไปในผิวหนังหมูที่มีความซับซ้อนได้มากขึ้น การเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันเป็น 6 และ 12 รอบต่อชั่วโมง ส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและเมื่อเพิ่มแรงดันที่ใช้ในการสกัดจาก 3 บาร์เป็น 6 บาร์ พบว่าส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 67.7 จากการศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค FT-IR พบว่าการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้ กล่าวได้ว่าการประยุกต์ใช้แรงกลไม่ชักนำให้โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนเสียสภาพ ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกโดยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูงสุดถึงร้อยละ 67.7 คือ ที่ความดัน 6 บาร์ จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดัน 12 รอบต่อชั่วโมงและเวลาที่ใช้ในการสกัด 48 ชั่วโมง

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือของหลายๆ ฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่ได้ให้คำแนะนำคำปรึกษาแนะนำวิธีแก้ปัญหา รวมถึงข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความดูแลเอาใจใส่ ติดตามการดำเนินโครงงานมาโดยตลอดและขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาวิศวกรรมเคมีและอาจารย์ประจำภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่าน ที่ได้ให้วิชาความรู้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

คุณค่าของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ศึกษาหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะก่อให้เกิดประโยชน์ทางวิชาการแก่บุคคลทั่วไป นิสิต นักศึกษาที่สนใจค้นคว้าและเพิ่มพูนความรู้เกี่ยวกับการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง

สุดท้ายนี้ผู้ดำเนินโครงงานใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้การดูแล อบรมสั่งสอนและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา ตลอดการดำเนินโครงงานจนสำเร็จการศึกษา

ผู้ดำเนินโครงงาน
นางสาวพรปิยา สารวิทย์
นายพีรณัฐ อินทร์แก้ว

พฤศจิกายน 2556

สารบัญ

หน้า

ใบรับรองปริญญานิพนธ์.....ก
บทคัดย่อ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ฉ
สารบัญรูป.....ช

บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน.....2
1.3 ขอบเขตในการดำเนินโครงงาน.....2
1.4 สถานที่ในการดำเนินโครงงาน.....3
1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน.....3
1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน.....3

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎี.....4
2.1 คอลลาเจน.....4
2.2 โครงสร้างของคอลลาเจน.....4
2.3 คุณสมบัติของคอลลาเจน.....5
2.4 ชนิดของคอลลาเจน.....6
2.5 การสกัดพื้นฐาน.....8
2.6 การสกัดคอลลาเจน.....11
2.7 องค์ประกอบและโครงสร้างของหมู.....14
2.8 การประยุกต์ใช้คอลลาเจน.....20
2.9 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง.....20
2.10 เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง.....22
2.11 การวิเคราะห์ Fourier Transform Infrared Spectroscopy.....23
2.12 การสำรวจเอกสารงานวิจัย.....24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการทดลอง....28

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์....28

3.2 วิธีการทดลอง....29

3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติ....33

บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์....34

4.1 ผลของการกำจัดไขมัน....34

4.2 ผลของสภาวะการสกัดคอลลาเจนที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ (%Yield)....35

4.3 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน....39

บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ....42

5.1 บทสรุป....42

5.2 ข้อเสนอแนะ....42

เอกสารอ้างอิง....43

ภาคผนวก ก....46

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน....3

2.1 ชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ....7

4.1 ผลของการกำจัดไขมัน....34

4.2 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน....39

4.3 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของกรดอะซิตริกมาตรฐาน....41

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของคอลลาเจน ก) ลำดับของกรดแอมิโน ข) โครงสร้างของโทรโปคอลลาเจน ค) การจัดเรียงตัวของโทรโปคอลลาเจนเป็นเส้นใยคอลลาเจน....5

2.2 Soxhlet Extraction Apparatus....10

2.3 แสดงการเปรียบเทียบผิวหนังของคนกับผิวหนังของหมู....19

2.4 ตัวอย่างการประยุกต์การใช้งานของคอลลาเจน ก) ผิวหนังเทียม ข) ทางด้านเครื่องสำอาง ค) กระดูกเทียม ง) ทางด้านเภสัชกรรม....20

2.5 แผนภาพ Phase Diagram....21

2.6 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันที่ 6 บาร์ ที่จำนวน 3 รอบต่อชั่วโมง....23

3.1 แผนผังกระบวนการสกัดคอลลาเจน....29

3.2 หนังหมูสะอาดที่ผ่านการบด....30

3.3 ก) ขั้นตอนการกำจัดไขมันโดยใช้สารละลายอะซิโตนและการปั่นกวน ข) นำหนังหมูที่ผ่านการกำจัดไขมันไปทำแห้งเยือกแข็ง....31

3.4 การสกัดคอลลาเจนโดยการปั่นกวน....31

3.5 ก) หนังหมูกับเอนไซม์เปปซินและกรดอะซิติกในถังใส่สารตัวอย่าง ข) การควบคุมอุณหภูมิในการสกัดคอลลาเจน ค) การควบคุมการอัดคลายแรงดันแบบช่วง....32

3.6 คอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากการทำแห้ง....33

4.1 กราฟเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ระหว่างการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันและการปั่นกวน....35

4.2 กราฟเปรียบเทียบผลของจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้....36

4.3 กราฟเปรียบเทียบผลของแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้....38

4.4 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน....39

4.5 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธี ก) การปั่นกวน เวลา 48 ชั่วโมง ข) การอัดคลายแรงดันที่ 3 บาร์ จำนวน 12 รอบต่อชั่วโมง เวลา 48 ชั่วโมง ค) การอัดคลายแรงดันที่ 6 บาร์ จำนวน 12 รอบต่อชั่วโมง เวลา 48 ชั่วโมง....40

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน

คอลลาเจน คือ สารที่คัดหลั่งชนิดหนึ่งจากเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโปรตีน (Connective Tissue Cells) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของชั้นผิวหนัง ทำหน้าที่เป็นตัวประสานเนื้อเยื่อของผิวหนังเข้าด้วยกัน โปรตีนชนิดนี้จะมีส่วนประกอบถึงร้อยละ 30 ของจำนวนโปรตีนทั้งหมดภายในร่างกาย โดยมีมากที่สุดที่ผิวหนัง ซึ่งจะมีประมาณร้อยละ 2 โดยจะปะปนอยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อคอลลาเจน คือ โปรตีนชนิดหนึ่งที่เป็นสายยาว ซึ่งทำหน้าที่แตกต่างจากสารโปรตีนโดยทั่วๆ ไป เส้นใยของคอลลาเจนจะถูกเรียกว่า คอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen Fiber) ที่ซึ่งจะมีลักษณะเป็นสายเกลียวที่มีหน่วยโมเลกุลเกี่ยวพันกันมากมาย โดยปกติทั่วไปผิวหนังที่มีคอลลาเจนเป็นโครงสร้างอยู่มากจึงมีความยืดหยุ่นได้ดีตามไปด้วย คอลลาเจนนั้นไม่ได้มีอยู่ที่ผิวหนังส่วนนอกเท่านั้น อวัยวะภายในร่างกายเองก็มีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบอยู่มาก ซึ่งได้แก่ พังผืด (Fascia) กระดูกอ่อน (Cartilage) เส้นเอ็น (Ligaments) ข้อต่อ (Tendons) และกระดูก (Bone) สารคอลลาเจนที่เป็นส่วนประกอบหลักของชั้นผิวมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า เคราติน (Keratin) ในปัจจุบันได้มีการนำคอลลาเจนมาใช้งานอย่างแพร่หลาย อาทิเช่น ใช้งานด้านอุตสาหกรรม ยา เครื่องสำอาง และการประยุกต์ใช้งานในด้านการแพทย์ [1-2]

การนำคอลลาเจนมาประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์ จะอยู่ในรูปแบบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering Technology) อาทิเช่น ผิวหนังสังเคราะห์ (Artificial Skin) และกระดูกเทียม (Artificial Bone) ซึ่งพบว่าสามารถขึ้นรูปจากคอลลาเจนและศึกษาการสร้างโครงสร้างภายนอกเซลล์ (Extracellular Matrices) จากคอลลาเจนเพื่อใช้ในทางการแพทย์กระดูกและผิวหนัง จากการศึกษาพบว่าคอลลาเจนสามารถชักนำให้เกิดการสร้างโครงสร้างภายนอกเซลล์ เพื่อใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อในการสร้างผิวหนังเทียมและกระดูกเทียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ [2]

ปัจจุบันกระบวนการสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปนิยมใช้กรดและเอนไซม์ในกระบวนการสกัดด้วยสารละลายกรด (Acid Soluble Collagen) อาทิเช่น กรดอะซิติก ซึ่งการสกัดด้วยกรดจะทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนเกิดการพองตัวและพันธะระหว่างโมเลกุลจะจับตัวกันแบบหลวมๆ ทำให้สามารถสกัดคอลลาเจนได้ [3] อย่างไรก็ตามข้อเสียของกระบวนการใช้กรด คือ เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีซึ่งส่งผลต่อสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของคอลลาเจน ในกระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์ (Enzyme Soluble Collagen) อาทิเช่น เปปซิน เป็นกระบวนการการสกัดที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากเอนไซม์เปปซินมีความจำเพาะในการตัดพันธะตำแหน่งทีโลเปปไทด์ออก ซึ่งทำให้ไม่เกิดอาการแพ้เมื่อนำไปประยุกต์ใช้งานกับร่างกายและในกระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์ร่วมกับการใช้กรด อาทิเช่น กรดอะซิติกร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ซึ่งเป็นกระบวนการสกัดที่ทำให้ได้คอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าการสกัดด้วยกรดเพียงอย่างเดียวและเอนไซม์ยังมีความจำเพาะในการตัดพันธะจึงทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่ได้มากกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์เพียงอย่าง

เดียว อย่างไรก็ตามกระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยกรด เอนไซม์ และเอนไซม์ร่วมกับกรดยังมีข้อเสีย คือ ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ต่ำ ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้แรงกลร่วมกับเอนไซม์หรือกรดที่จะสามารถเพิ่มปริมาณการสกัดคอลลาเจนได้ ซึ่งการประยุกต์ใช้แรงกลดังกล่าว คือ เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง [4]

การประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงเป็นเทคนิคทางกลที่สามารถเพิ่มปริมาณการสกัดคอลลาเจนได้ จากรายงานการศึกษาของ I. Prasertsung และคณะ [5] ซึ่งได้ศึกษาการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์ของหนังหมูโดยใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง พบว่าเมื่อเพิ่มแรงดันจะส่งผลทำให้เอนไซม์สามารถแทรกซึมเข้าไปในชั้นหนังหมูได้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ถูกกำจัดได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยใช้กรดและเอนไซม์ร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง พบว่าปริมาณการสกัดคอลลาเจนที่ได้ยังเป็นผลที่ไม่น่าพอใจเท่าที่ควร [6] เนื่องจากเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ศึกษามีสภาวะแรงดัน จำนวนรอบและเวลาในการดำเนินการยังไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลให้ปริมาณการสกัดคอลลาเจนที่ได้มีปริมาณน้อย

ดังนั้นในการศึกษางานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยใช้กรดและเอนไซม์ร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ให้ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้สูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกและเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique)

1.3 ขอบเขตในการดำเนินโครงงาน

1.3.1 ตัวแปรต้น

1.3.1.1 จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (3-12 รอบต่อชั่วโมง)

1.3.1.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน (0-48 ชั่วโมง)

1.3.1.3 แรงดัน (3-6 บาร์)

1.3.2 ตัวแปรควบคุม

1.3.2.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนโดยใช้วิธีการปั่นกวนของสารละลายกรดอะซิติกร่วมกับเอนไซม์เปปซิน 4-10 องศาเซลเซียส

1.3.2.2 เอนไซม์เปปซินร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรกับกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์

1.3.2.3 อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของหนังหมูต่อสารละลายอะซิโตนที่ 1:10

1.3.2.4 หนังหมูสดจากหมูช่วงอายุ 3-6 เดือน

1.4 สถานที่ในการดำเนินโครงงาน

อาคารปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน

ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2556 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2556

1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน

ตารางที่ 1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน

	การดำเนินโครงงาน	ช่วงเวลา							
		พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
1.6.1	วางแผนการดำเนินงาน	←	→						
1.6.2	ศึกษาค้นคว้าข้อมูลในการทำโครงงาน		←	→					
1.6.3	หาแหล่งวัตถุดิบและเครื่องมือเพื่อทดลอง			←	→				
1.6.4	ทำการทดลอง			←			→		
1.6.5	วิเคราะห์ผลการทดลอง					←		→	
1.6.6	สรุปผลการทดลอง						←	→	
1.6.7	ทำรูปเล่มรายงาน				←			→	

บทที่ 2
หลักการและทฤษฎี

2.1 คอลลาเจน [7]

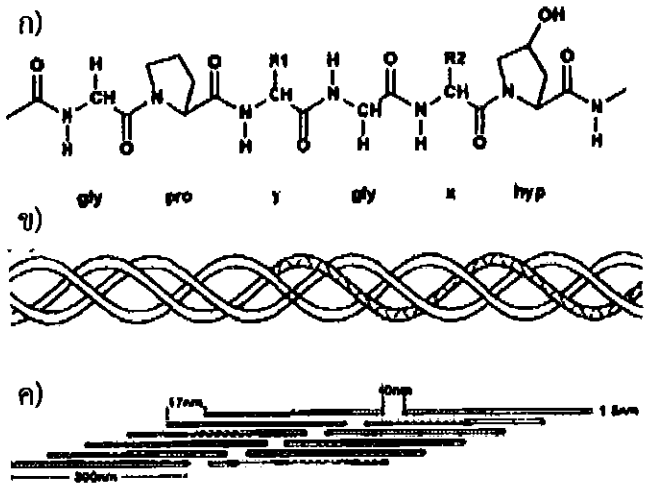
เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดและสารประกอบเชิงซ้อนโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ คอลลาเจน อีลาสติน และเรติคิวลิน โดยที่โปรตีนส่วนใหญ่ที่พบ คือ คอลลาเจน ส่วนสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน ได้แก่ อีลาสตินโปรติโอไกลแคนและโพลีแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ ซึ่งโปรติโอไกลแคนและโพลีแซคคาไรด์ขนาดใหญ่นี้จะอยู่รวมกับน้ำเกิดเป็นสารที่เรียกว่า Ground Substance โดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่แตกต่างกัน จะทำให้มีปริมาณของคอลลาเจนและสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนที่แตกต่างกัน แต่ส่วนใหญ่จะพบสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนอยู่ในปริมาณน้อย ตัวอย่างเช่น เอ็น จะมีปริมาณคอลลาเจนอยู่ประมาณร้อยละ 95 (น้ำหนักแห้ง) ส่วนอีลาสตินจะมีอยู่เพียงเล็กน้อยประมาณร้อยละ 1 (น้ำหนักแห้ง)

คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะพบมากในร่างกายของสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งมีประมาณร้อยละ 30 ของโปรตีนทั้งหมดโดยจะพบมากในผิวหนัง เอ็นกระดูก และกระดูกอ่อนโดยที่ปริมาณคอลลาเจนจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อและอายุของสัตว์ส่วนลักษณะของคอลลาเจนโดยทั่วไปคล้ายคลึงกันจะต่างกันเพียงเล็กน้อยในองค์ประกอบของกรดแอมิโน

2.2 โครงสร้างของคอลลาเจน

คอลลาเจนมอนอเมอร์เป็นโปรตีนทรงกระบอกยาว (Long Cylindrical Protein) มีความยาวประมาณ 2800 AO และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 14-15 AO ซึ่งประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 3 สาย ซึ่งแต่ละสายเรียกว่า สายแอลฟา (α-chain) และแต่ละสายจะมีกรดแอมิโนมากกว่า 1000 ตัวต่อกัน โดยทั่วไปจะประกอบด้วย กรดแอมิโนชนิดไกลซีน (Glycine, Gly) ประมาณ 1 ใน 3 ของกรดแอมิโนทั้งหมดในโมเลกุลคอลลาเจนและมีกรดอิมิโน (Imino Acid) ประมาณ 1 ใน 4 โดยแยกเป็นโพรลีนร้อยละ 12 และไฮดรอกซีโพรลีนร้อยละ 11 ซึ่งลักษณะการเรียงตัวของกรดแอมิโนจะมีลักษณะซ้ำๆ กันของ -Gly-X-Y- โดย X และ Y มักเป็นโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนตามลำดับ

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สำคัญ 2 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในคอลลาเจน ซึ่งจะเปลี่ยนโพรลีนเป็นไฮดรอกซีโพรลีนและเปลี่ยนไลซีนเป็นไฮดรอกซีไลซีน ปฏิกิริยานี้จะถูกเร่งโดยเอนไซม์โพรลีนไฮดรอกซีเลส (Proline Hydroxylase) และไลซีนไฮดรอกซีเลส (Lysine Hydroxylase) ตามลำดับ ซึ่งระบบเอนไซม์ดังกล่าวมีการใช้ Oxygen, α-Ketoglutarate, Ferrous ion และ Reducingsubstance เช่น Ascorbate และถ้าปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้มีตัวเร่งเป็นเอนไซม์ Lysyl Oxidase (Coppercontaining Enzyme) จะมีการเปลี่ยนแปลงได้เป็น 1-Amino-1-Carboxy-Pentan-5-Al ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะเชื่อมข้ามของคอลลาเจน



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของคอลลาเจน ก) ลำดับของกรดแอมิโน ข) โครงสร้างของโทรโปคอลลาเจน ค) การจัดเรียงตัวของโทรโปคอลลาเจนเป็นเส้นใยคอลลาเจน
ที่มา: ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์ (2551)

แต่ละสายของโพลีเปปไทด์จะวนเป็นเกลียวไปทางซ้าย (Left-Hand Helix) ซึ่งมีพันธะไฮโดรเจนโดยแต่ละรอบมี 3.3 Residues และมีระยะห่างระหว่างเกลียวเท่ากับ 0.87 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 2.1 ก) จากนั้นสายโพลีเปปไทด์ทั้ง 3 สายจะพันรอบกันเองเป็นเกลียววนขวา (Right-Handhelix) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายโพลีเปปไทด์แต่ละสาย ซึ่งเรียกสายเปปไทด์ที่บิดรวมกัน 3 สายนี้ว่า โทรโปคอลลาเจน (Tropocollagen) ซึ่งมีระยะห่างระหว่างเกลียวประมาณ 8.6 นาโนเมตร โดยน้ำหนักโมเลกุลของโทรโปคอลลาเจน 300 กิโลดัลตัน และจะมีความยาวประมาณ 300 นาโนเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 นาโนเมตร ดังรูปที่ 2.1 ข) นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่ไม่บิดตัวรวมกันเป็นเกลียวเรียกบริเวณนี้ว่าทีโลเปปไทด์โซน์ (Telopeptide Zone) ซึ่งโทรโปคอลลาเจนจะเรียงตัวขนานกันโดยมีแรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander Waals Force) และไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) เชื่อมระหว่างโทรโปคอลลาเจนทำให้เกิดลักษณะเป็นเส้นใยของคอลลาเจน ดังรูปที่ 2.1 ค)

2.3 คุณสมบัติคอลลาเจน

การที่โครงสร้างของคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเกลียวโดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อม ดังรูปที่ 2.1 ข) ทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงมากขึ้น ความคงตัวมากขึ้น และเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ยาก ทำให้คอลลาเจนไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งความแข็งแรงของคอลลาเจนโมเลกุลยังเกิดจากการสร้างสะพานเชื่อมต่อกันทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล (Intra และ Inter Molecular Cross Linkage) สัตว์ที่มีอายุมากจะมีปริมาณสะพานเชื่อมเพิ่มขึ้นจึงทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงมากขึ้น

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในกรดหรือเบสเจือจาง แต่จะพองตัวและเมื่อความเข้มข้นของกรดหรือเบสมากขึ้นจะทำให้คุณสมบัติการละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากพันธะเชื่อมข้ามของคอลลาเจนถูกทำลายบางส่วน แม้ว่าที่สภาวะเป็นกลางคอลลาเจนจะมีโครงสร้างที่แน่นและมีความแข็งแรงมาก แต่โมเลกุลเดี่ยวๆ ก็ยังสามารถแยกตัวออกมาได้ โดยการลด Ionic Strength และค่าพีเอชเป็นผลให้คอลลาเจนเกิดการพองตัวและละลายในที่สุด อย่างไรก็ตามโมเลกุลดังกล่าวยังคงสภาพเดิม (Native Form) คือ ยังคงมีฮีลิกซ์ 3 สายอยู่และหากทำให้สภาวะดังกล่าวกลับมาอยู่ในสภาวะเดิมก็มีความเป็นไปได้ที่คอลลาเจนสามารถกลับสู่สภาพเดิม แต่สิ่งสำคัญต้องหลีกเลี่ยงความร้อน เนื่องจากฮีลิกซ์จะเสียสภาพที่อุณหภูมิระหว่าง 35-40 องศาเซลเซียส สิ่งนี้เป็นสิ่งที่บ่งชี้อุณหภูมิในการหดตัว (Shrink Temperature) ของคอลลาเจนและจะเกิดอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิวิกฤต (Critical Temperature) ซึ่งตรวจวัดโดย Pyrolidine-Residue (Proline และ Hydroxyproline) Content ในคอลลาเจน เช่น อุณหภูมิวิกฤตในการหดตัวของคอลลาเจนจากปลา เอ็นที่หางหนู และกล้ามเนื้อวัว จะอยู่ที่ประมาณ 45 61 และ 64 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และถ้าให้ความร้อนสูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนหดตัวได้จะทำให้คอลลาเจนเปลี่ยนเป็นเจลาติน แต่ทั้งนี้ต้องมีน้ำอยู่ด้วยในขณะให้ความร้อน

การที่โครงสร้างคอลลาเจนประกอบด้วยโพรลีน จะช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับโครงสร้างฮีลิกซ์ โดยช่วยในการป้องกันการหมุนของพันธะระหว่างไนโตรเจนและคาร์บอน (N-Cbond) โดยส่วนไฮดรอกซีโพรลีน ก็มีส่วนช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับโมเลกุลของคอลลาเจน ซึ่งคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นของกรดอิมิโนน้อยจะมีการเสื่อมสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่าที่ความเข้มข้นของกรดแอมิโนสูง

2.4 ชนิดของคอลลาเจน [8]

ในปัจจุบันคอลลาเจนที่พบมีทั้งหมดกว่า 30 ชนิด โดยการแบ่งประเภทของคอลลาเจนแบ่งตามมวลโมเลกุล การจัดเรียงตัวของกรดแอมิโน ความยาวของสายฮีลิกซ์ และคุณสมบัติของส่วนที่ไม่เป็นสายฮีลิกซ์คอลลาเจนชนิดที่พบมาก คือ คอลลาเจน Type I II III และ IV แสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งในการศึกษามักจะใช้คอลลาเจน Type I เนื่องจากมีปริมาณมากและมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในวงการแพทย์ ซึ่งคอลลาเจน Type I นี้พบได้ส่วนใหญ่ในสัตว์ชั้นสูงในส่วนของเอ็น หนัง และกระดูก โดยจะประกอบด้วย 3 สาย ซึ่งจะได้แก่ สาย α1(I) จำนวน 2 สาย และ α 2(I) จำนวน 1 สายซึ่งสาย α1(I) และ α2(I) จะมีองค์ประกอบของกรดแอมิโนที่แตกต่างกัน คอลลาเจนชนิดนี้จะพบกรดแอมิโนชนิดไกลซีนประมาณ 1 ใน 3 ของกรดแอมิโนทั้งหมด มีส่วนที่ไม่บิดเป็นเกลียวสั้น ประกอบด้วยไทโรซีนและฮิสติดีนไม่พบทริปโตเฟนและซีสเตอีน

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ [9]

ที่มา: สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพณิชยกิจ (2551)

Collagen Type	Chain Compossition	Tissue Distribution
I	$(\alpha 1(I))_2\alpha 2(I)$, Trimer$(\alpha 1(I))_3$	Skin, Tendon, Bone, Cornea, Dentin, Fibrocartilage
II	$(\alpha 1(II))_3$	Hyaline Cartilage, Vitreous, Nucleus Pulposus, Notochord
III	$(\alpha 1(III))_3$	Large Vessels, Uterine Wall, Dermis, Intestine, Heart Valve, Gingiva (Usually Coexists With Type I Except In Bone, Tendon, Cornea)
IV	$(\alpha 1(IV))_2$ $\alpha 2(IV)$	Basement membranes in all organs
V	$\alpha 1(V)$ $\alpha 2(V)(3(V)$ or $(\alpha 1(V))_2\alpha 2(V)$ or $(\alpha 1(V))_3$	Cornea, Placental Membranes, Bone, Large Vessels, Hyaline Cartilage, Gingival, Tendons, Interstitial Tissues
VI	$\alpha 1(VI)$ $\alpha 2(VI)$ $\alpha 3(VI)$	Descemet's Membrane, Skin, Nucleus Pulposus, Heart Muscle, Liver, Kidney, Perichondrium
VII	$(\alpha 1(VII))_3$	Skin, Placenta, Lung, Cartilage, Cornea, Epidermal/Dermal Junction
VIII	$\alpha 1(VIII)$ $\alpha 2(VIII)$ Chain Organization Of Helix	Produced by Endothelial Cells, Descemet's Membrane

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ตารางแสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ

ที่มา: สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพณิชยกิจ (2551)

Collagen Type	Chain Composition	Tissue Distribution
IX	$\alpha1$(IX) $\alpha2$(IX) $\alpha3$(IX)	Cartilage
X	$(\alpha1(X))_3$	Hypertrophic And Mineralizing Cartilage
XI	1 $\alpha2$ $\alpha3$ $\alpha1$ or $\alpha1$(XI) $\alpha2$(XI) $\alpha3$(XI)	Cartilage, Intervertebral Disc, Vitreous Humour
XII	$(\alpha1(XII))_3$	Chicken Embryo Tendon, Bovine PeriodontalLigament, Tendons and Fibril Associated Collagen
XIII	Unknown	Cetal Skin, Bone, Intestinal Mucosa, Epidermis, Hair Follicles and Nail Root Cells
XIV	Unknown	Same as Type I
XV	Unknown	Many Tissues, Homology To Type XVIII
XVI	Unknown	Under Study
XVII	Unknown	Hemidesmosomes and Skin
XVIII	Unknown	Liver and Kidney
XIX	Unknown	Eyes, Brain, Testes, and Embryonic Tissues
XX - XXV	Unknown	Unknown

2.5 การสกัดพื้นฐาน [10]

การสกัดเป็นเทคนิคที่สำคัญในการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายแยกเอาสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยความสามารถในการละลายเฉพาะตัวของสารในตัวทำละลายที่ใช้ สารผสมนั้นอาจเป็นสารผสมที่ได้จากปฏิกิริยาเคมีหรือเป็นสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ

2.5.1 ประเภทของการสกัด

2.5.1.1 การสกัดอย่างง่าย (Simple Extraction)

ก. การสกัดอย่างธรรมดา (Ordinary Extraction)

วิธีนี้เป็นการสกัดสารอินทรีย์ที่อยู่ในสภาพเป็นสารละลายโดยใช้ตัวทำละลายที่ไม่ละลายในสารละลายนั้นเป็นตัวสกัดเครื่องมือที่ใช้ในการสกัด คือ กรวยแยก (Separatory Funnel)

ข. การสกัดโดยใช้กรดหรือด่าง (Acid and Alkaline Extraction)

ในกรณีที่สารอินทรีย์มีสภาพเป็นกรดและปนอยู่กับสิ่งเจือปนจะใช้ด่างสกัด เมื่อกรดละลายในด่างจะทำให้แยกสิ่งเจือปนออกมาได้หรือในทางตรงข้ามถ้าสารอินทรีย์มีสภาพเป็นด่างปนอยู่กับสิ่งเจือปนจะใช้กรดสกัดและเมื่อสารอินทรีย์ที่มีสภาพเป็นด่างละลายในกรดจะทำให้สามารถแยกออกจากสิ่งเจือปนได้ จากนั้นนำสารที่สกัดได้นี้ไปทำให้เป็นกรดในกรณีที่ใช้ด่างสกัดหรือทำให้เป็นด่างในกรณีที่ใช้กรดสกัด

2.5.1.2 การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous Extraction)

ก. Light-Solvent Extraction

เครื่องมือนี้เหมาะสำหรับการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่เบากว่าน้ำ

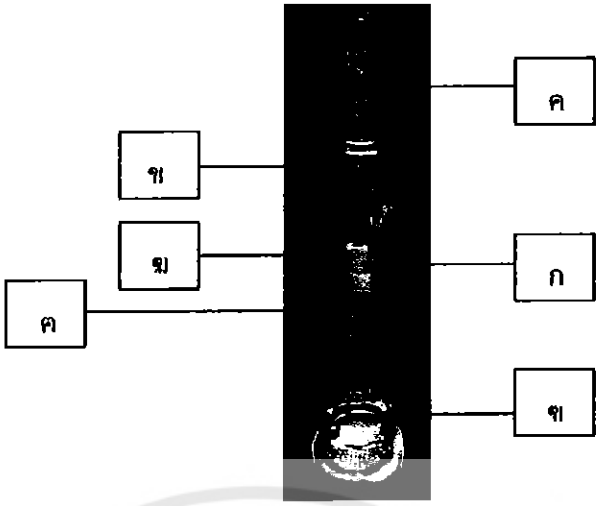
ข. Heavy-Solvent Extraction

เครื่องมือนี้เหมาะสำหรับการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่หนักกว่าน้ำ

ค. Soxhlet Extraction Apparatus

อุปกรณ์ชนิดนี้เหมาะสมสำหรับทำการสกัดสารที่เป็นของแข็งโดยใช้ตัวทำละลายที่ร้อนเป็นตัวสกัด ส่วนใหญ่จะนิยมใช้สกัดสารจากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติโดยการเอาของแข็งที่ต้องการสกัดใส่ในภาชนะ ก) ที่เรียกว่า Porus Thimble (เป็นภาชนะที่มีรูปร่างคล้ายหลอดทดลองที่มีขนาดใหญ่ทำด้วยกระดาษที่มีรูพรุน) ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะ ข) โดยจะเรียกว่า Soxhlet Chamber จากนั้นจะใส่ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลงในขวดก้นกลม ข) โดยเมื่อให้ความร้อนแก่ขวดก้นกลม ข) จนกระทั่งตัวทำละลายเดือดกลายเป็นไอ ไอของตัวทำละลายจะผ่านเข้าไปหลอด ค) และเข้าสู่เครื่องควบแน่น ค) แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลวลงไปสู่ Thimble ก) พร้อมกับละลายสารจากของแข็งที่อยู่ใน Thimble ก) ลงมาใน Chamber เมื่อระดับของเหลวใน Chamber สูงจนถึงระดับของหลอด ฆ) ซึ่งเรียกว่า Siphon Arm ของเหลวนี้จะไหลจาก Chamber ลงสู่ขวดก้นกลม ค) อีกครั้งหนึ่งพร้อมกับนำสารที่สกัดได้จากของแข็งใน Thimble ก) ลงสู่ขวดก้นกลมด้วยซึ่งกระบวนการสกัดนี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งได้สารอินทรีย์ออกมามากพอแล้วจึงหยุดสกัด แสดงดังรูปที่ 2.2

เทคนิคในการนำสารอินทรีย์ออกจากตัวทำละลายที่อยู่ในขวดก้นกลม ข) สามารถทำได้หลายเทคนิคขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เช่น การระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ (Rotatory Evaporator) หรือเทคนิคการกลั่น เป็นต้น



รูปที่ 2.2 Soxhlet Extraction Apparatus
ที่มา: ผศ.ดร. ศิริรัตน์ จันท์จารุณี (2551)

2.5.2 ตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด [11]

2.5.2.1 ชนิดของตัวทำละลาย

ต้องเหมาะสมกับการสกัดสารที่สนใจโดยอาศัยหลักการ Like Dissolve Like

2.5.2.2 ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้สกัด

ปริมาตรตัวทำละลายต้องมีมากพอ คือ เมื่อตัวทำละลายส่วนหนึ่งเกิดการระเหยขึ้นไปสกัดสารก่อนที่จะเต็ม Reflux Sidearm แล้วจากนั้นจะเป็นแบบลักษณะของกาลักน้ำต่อไปในส่วนของ Flask ก็จะต้องมีตัวทำละลายเหลืออยู่เพื่อทำให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา ซึ่งตัวทำละลายที่มากเกินพอสามารถระเหยออกได้เมื่อสกัดสารที่สนใจได้ตามที่ต้องการด้วยเครื่อง Rotary Evaporator

2.5.2.3 เวลาที่ใช้สกัด

เวลาที่ใช้สกัดต้องมีความเหมาะสมที่จะสามารถสกัดเอาสารที่สนใจออกจากตัวอย่างให้ได้มากที่สุด ซึ่งในเทคนิคนี้ส่วนใหญ่เวลาที่ใช้สกัดมักยาวนานเป็นชั่วโมง เพื่อให้เกิดการ Reflux ของตัวทำละลายหลายๆ ครั้งทำให้สารที่สนใจถูกสกัดออกจากตัวอย่างได้มากที่สุด

2.5.2.4 ตัวอย่าง

เทคนิคนี้ตัวอย่างมักเป็นของแข็ง ดังนั้นต้องทำตัวอย่างให้มีพื้นผิวสัมผัสกับสารมากที่สุด คือ พยายามสับหรือทั่นให้ตัวอย่างมีขนาดเล็กที่สุดเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส ข้อดีของการสกัดแบบง่าย คือ เป็นเทคนิคที่มีราคาถูก (เฉพาะราคาตัวทำละลาย) ค่อนข้างทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยากมากนัก ข้อด้อย คือ ใช้เวลาสกัดนานอาจมีการตกค้างของตัวทำละลายและมีตัวทำละลายอินทรีย์เหลือเป็น

Waste หลังจากที่กระบวนการเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้มักมีความเป็นพิษทั้งต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม (ในกรณีที่ทิ้งแบบที่ไม่มีการจัดการที่ดี)

2.6 การสกัดคอลลาเจน [12]

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการล้างทำความสะอาดวัตถุดิบ แล้วจึงทำให้คอลลาเจนที่มีอยู่ละลายออกมาโดยใช้กรด เช่น กรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือการใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์เปปซิน เนื่องจากสามารถทำงานได้ที่พีเอชต่ำ (พีเอช 2-3) และมีความสามารถในการตัดส่วนทีโลเปปไทด์ ทำให้ได้ส่วนของเปปไทด์เล็กๆ ละลายอยู่ ซึ่งมีผลดี คือ ส่วนทีโลเปปไทด์โซนจะทำให้เกิดการแพ้และการสกัดโดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินทำให้ได้คอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าการสกัดโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว จากนั้นจึงนำไปตกตะกอนโดยใช้เกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ วัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนมีความหลากหลาย

การสกัดคอลลาเจนที่มีอยู่ให้ละลายออกมาก็ทำได้หลายวิธี ขึ้นกับอายุของสัตว์และชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัด ดังนี้

2.6.1 คอลลาเจนที่ละลายในสารละลายเกลือ (Neutral Salt Soluble Collagen)

คอลลาเจนที่ละลายในสารละลายเกลือ (Neutral Salt Soluble Collagen) เนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะมีคอลลาเจนชนิดนี้อยู่น้อยหรือไม่มีเลย คอลลาเจนชนิดนี้จะละลายได้ในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง (โซเดียมคลอไรด์ 0.15-2 โมลาร์) หรือกรดอะซิติกเจือจาง เช่น โซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ และ 0.05 โมลาร์ Tris-HCl พีเอช 7.4 อย่างไรก็ตามยังพบคอลลาเจนชนิดนี้ในเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ที่ยังไม่มีการสร้างพันธะข้าม (Crosslink) สารละลายเกลือจะสกัดโมเลกุลของคอลลาเจนในเนื้อเยื่อที่ไม่มีพันธะข้าม การสกัดจะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ อัตราการเขย่า และปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัดต่อเนื้อเยื่อ การทำบริสุทธิ์คอลลาเจนที่สกัดได้แล้วโดยการทำไดอะไลซ์ (Dialysed) การตกตะกอนและการเหวี่ยงแยก คอลลาเจนที่สกัดได้จะประกอบด้วยคอลลาเจน Type I และ Type III เล็กน้อย

2.6.2 คอลลาเจนที่ละลายในสารละลายกรด (Acid Soluble Collagen)

คอลลาเจนสามารถละลายได้ในสารละลายกรดเจือจาง เช่น พวกกรดอะซิติก พันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัว กรดจะมีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าสารละลายเกลือ คอลลาเจนที่สกัดโดยการใช้กรดเจือจางจะเป็นคอลลาเจน Type I สำหรับการสกัดคอลลาเจนจะมีปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) มาเกี่ยวข้อง ไฮโดรไลซีสเป็นปฏิกิริยาที่มีน้ำเข้าไปทำปฏิกิริยาทำให้สารตั้งต้นหลุดออก ไฮโดรไลซีสของเกลือ หมายถึง ปฏิกิริยาระหว่างเกลือกับน้ำ เกลือเป็นอิเล็กโทรไลต์แก่ เมื่อเกลือละลายในน้ำ เกลือจะแตกตัวออกเป็นไอออนบวกและไอออนลบทั้งหมด ดังนั้นสมบัติของสารละลายของเกลือ จึงขึ้นอยู่กับไอออนบวกและไอออน-

ลบในสารละลาย ไอออนบางตัวสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับน้ำและให้ H^+ หรือ OH^- จึงเรียกปฏิกิริยานี้ว่า ไฮโดรไลซีส สำหรับไอออนบวก เช่น $NH_4^+{}_{(aq)}$ เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ จะเขียนสมการได้ดังนี้

$$NH_4^+(aq) + H_2O \leftrightarrow NH_3(g) + H_3O^+(aq) \qquad (2.1)$$

จะเห็นว่าจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไอออนบวก $NH_4^+{}_{(aq)}$ ที่เกิดขึ้น NH_4^+ จะให้โปรตอนกับ $H_2O_{(l)}$ แล้วได้ $H_3O^+{}_{(aq)}$ ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงมีสมบัติเป็นกรดสำหรับไอออนลบ เช่น CH_3COO^- เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำจะเขียนสมการดังนี้

$$CH_3COO^-(aq) + H_2O(l) \leftrightarrow CH_3COOH(aq) + OH^-(aq) \qquad (2.2)$$

จะเห็นได้ว่าจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไอออนลบ CH_3COO^- ที่เกิดขึ้น $CH_3COO^-{}_{(aq)}$ จะรับ H^+ จากน้ำแล้วได้ $OH^-{}_{(aq)}$ ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงมีสมบัติเป็นเบส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ถ้าไอออนลบของเกลือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสจะทำให้สารละลายแสดงสมบัติความเป็นเบสและถ้าไอออนบวกของเกลือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสจะทำให้สารละลายแสดงสมบัติความเป็นกรด

2.6.3 คอลลาเจนที่ละลายโดยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin Soluble Collagen)

คอลลาเจนที่ละลายโดยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin Soluble Collagen) ที่สภาวะความเป็นกรดพีเอช 2.5 คอลลาเจนที่สกัดได้จากตัวอ่อน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สร้างใหม่ (Pre-Mature) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เจริญเต็มที่ (Mature) โดยใช้จำนวนเอนไซม์เปปซินต่อซับสเตรทเท่ากับ 1 ต่อ 10 ในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ (พีเอช 2.5) ที่อุณหภูมิ 4-15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-72 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นกับตัวอย่างที่นำมาสกัดคอลลาเจน การการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้คอลลาเจนที่ยังคงมีบริเวณที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว ที่เรียกว่าส่วนที่โลเปปไทด์ ซึ่งจะไม่สามารถจะนำคอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดไปใช้ในทางการแพทย์ได้เพราะจะทำให้เกิดอาการแพ้ การแก้ปัญหาดังกล่าวจึงนำเอนไซม์มาใช้ร่วมในการสกัด โดยส่วนใหญ่จะนิยมใช้เอนไซม์เปปซิน ซึ่งเอนไซม์เปปซินจะมีความจำเพาะในการตัดพันธะที่ส่วนที่โลเปปไทด์ซึ่งเป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Amino Acid) ทำให้ที่โลเปปไทด์ถูกกำจัดออก ดังนั้นจึงทำให้สามารถนำคอลคาเจนที่สกัดได้จากการใช้เอนไซม์ไปใช้งานได้

2.6.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ [13]

ก. ความเข้มข้นของซับสเตรท

เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรทเพิ่มขึ้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่มีความเร็วสูงสุด ในกรณีที่มีซับสเตรทเพียงชนิดเดียวและความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ หลังจาก

นั้นแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็ไม่เพิ่มขึ้น ในบางกรณีความเข้มข้นของซับสเตรทที่สูงเกินไปอาจยับยั้งปฏิกิริยาทำให้อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาลดลงได้

ข. ความเข้มข้นของเอนไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์เมื่อมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของซับสเตรท ค่าพีเอช และอุณหภูมิคงที่ ยกเว้นในกรณีต่างๆ ดังนี้ คือ อัตราการละลายของซับสเตรทมีขีดจำกัด เช่น การละลายของออกซิเจนในระบบที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน การผันแปรสมบัติของซับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์จนทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือการที่โคแฟคเตอร์ที่จำเป็นสำหรับเอนไซม์แตกตัวออกจากเอนไซม์ เป็นต้น

ค. ค่าพีเอช

เอนไซม์ส่วนใหญ่จะเร่งปฏิกิริยาในช่วงพีเอชระหว่าง 4-10 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 4 หรือสูงกว่า 10 จะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างถาวรยกเว้น เพปซิน เรนนิน และอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ทุกชนิดเป็นโปรตีนการเปลี่ยนแปลงพีเอชมีผลต่อประจุบนโมเลกุลของโปรตีนจึงมีผลต่อการทำงานที่บริเวณเร่ง (Active Site) ของเอนไซม์และจะมีผลสูงสุดเมื่อมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนหรือไฮดรอกซิลไอออนมากจนถึงจุดพีไอ ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลแบบตติยภูมิของโปรตีนถูกทำลายจึงทำให้การรวมตัวของเอนไซม์กับซับสเตรทที่บริเวณเร่งไม่สามารถเกิดขึ้นได้เอนไซม์แต่ละชนิดมีค่าพีเอชที่เหมาะสม

ฅ. อุณหภูมิ

การเพิ่มอุณหภูมิทำให้สารที่ทำปฏิกิริยามีพลังงานมากพอที่จะทำให้สารนั้นกลายเป็นสารที่ถูกกระตุ้นแล้วมีพลังงานสูงอยู่ในสภาพที่จะเปลี่ยนไปเป็นผลิตผลอย่างรวดเร็ว การเพิ่มอุณหภูมิจึงทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นแต่การเพิ่มอุณหภูมิทำให้โปรตีนซึ่งมีโครงรูปสามมิติที่ต้องจัดเรียงตัวของหมู่ต่างๆ ในโมเลกุลโดยเฉพาะบริเวณเร่งให้พอเหมาะแก่การจับกับซับสเตรทแล้วเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลผลิตได้เมื่อมีอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนแปลงสภาพจากธรรมชาติจึงทำให้เอนไซม์มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาลดลงหรือเสียไป

ง. แอกติวิตีของน้ำ

การทำงานของเอนไซม์จะเกิดได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นสารละลายในน้ำยกเว้นเอนไซม์บางชนิด เช่น ไรโบนิวเคลียเอสและไลโซไซม์ เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายทั้งเอนไซม์และซับสเตรทจึงทำให้มีการการชนกันของโมเลกุลทั้ง 2 ชนิด จนสามารถจับตัวกันได้ยิ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส น้ำยังทำหน้าที่เป็นซับสเตรทด้วยปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดีเมื่อมีค่าแอกติวิตีของน้ำค่อนข้างสูง

จ. โคแฟคเตอร์ของเอนไซม์

เอนไซม์จำนวนมากจะเร่งปฏิกิริยาได้ต่อเมื่อมีโคแฟคเตอร์ร่วมทำงานด้วย เช่น พอลิฟีนอลออกซิเดสต้องมีไอออนของทองแดง แอลฟาอะไมเลสต้องมีไอออนของแคลเซียม เป็นต้น หากขาดโคแฟคเตอร์ก็จะทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้

ฉ. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป็นสารที่มีผลทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาลดลง เช่น ทริปซินอินฮิบิเตอร์ที่พบในถั่วเหลือง ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน

2.7 องค์ประกอบและโครงสร้างของหมู [14]

โครงสร้างของสัตว์ หมายถึง ส่วนประกอบของร่างกายสัตว์ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกระดูกอ่อน เนื้อเยื่อผิวหนัง และเนื้อแดง รวมทั้งเนื้อเยื่อไขมัน เป็นต้น สัตว์แต่ละชนิดมีส่วนประกอบในร่างกายที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ สามารถนำมาเป็นอาหารของมนุษย์ได้ทุกส่วนตามวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันแต่เมื่อกล่าวถึงเนื้อสัตว์มักให้ความสำคัญที่กล้ามเนื้อโครงร่างของสัตว์ทั้งที่ความจริงก็ยังมีส่วนของไขมัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันหรืออื่นๆ แทรกอยู่ด้วย

2.7.1 กระดูก

กระดูก (Bone) เป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เป็นแกนหรือเป็นโครงสร้างสำคัญให้แก่ร่างกาย ในกระดูกมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุด กระดูกประกอบด้วยเซลล์เส้นใยและสารระหว่างเซลล์ซึ่งเป็นแคลเซียมเกือบทั้งหมด ดังนั้นจึงทำให้กระดูกมีลักษณะเป็นของแข็งที่เสริมสร้างกันเองขึ้นเป็นโครงร่างของร่างกายสัตว์และเป็นหลักให้กล้ามเนื้อและเอ็นสามารถยึดติดเข้าด้วยกันเป็นรูปร่างของสัตว์และยังช่วยให้สัตว์สามารถเคลื่อนไหวไปมาได้ กระดูกมี 2 ลักษณะ ได้แก่ กระดูกโปร่ง (Spongy Bone) และกระดูกแข็ง (Compact) ส่วนของกระดูกโปร่งมีลักษณะโปร่งมีเส้นใยกระดูกและส่วนที่สร้างเม็ดเลือดอยู่ภายใน ส่วนกระดูกแข็งมีลักษณะเป็นแท่งทึบแน่นภายในกลวงแต่มีความแข็งมาก ในร่างกายสัตว์มีกระดูกที่มีรูปร่างยาวๆ อาทิเช่น กระดูกขาสะโพก (Femur) หรือแขน (Humerus) ซึ่งที่บริเวณท่อนยาว (Shaft) ของมันประกอบไปด้วยกระดูกแข็งที่ภายในกลวงและมีส่วนที่สร้างเม็ดเลือดอยู่ภายในนั้น ส่วนบริเวณปลายทั้งสองของท่อนยาวเป็นกระดูกโปร่งที่มีกระดูกแข็งหุ้มเป็นชั้นบางๆ อยู่รอบนอกการเติบโตของกระดูกจะเกิดขึ้นในบริเวณเหล่านี้

2.7.2 กระดูกอ่อน

กระดูกอ่อน (Cartilages) ประกอบไปด้วยเซลล์เนื้อเยื่อและเส้นใยรวมตัวกันอยู่ภายในสารระหว่างเซลล์หรือที่เรียกว่า “เมทริกซ์ (Matrix)” ซึ่งมีสภาพกึ่งแข็งกึ่งอ่อน เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเมทริกซ์มีชื่อเรียกว่า “คอนโดบลาสต์” กระดูกอ่อนจะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นแผ่นบางที่เรียกว่า “เพอริคอนเดรีย” ดังนั้นกระดูกอ่อนจึงอาจนับเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันพิเศษชนิดหนึ่ง กระดูกอ่อนถูกแบ่งตามปริมาณเส้นใยคอลลาเจน (Collagenous Fibers) และอิลาสติน (Elastin Fibers) ที่เป็นส่วนประกอบ ซึ่งแบ่งกระดูกอ่อนได้เป็น 3 ชนิด

2.7.2.1 กระดูกอ่อนไฮอาลีน (Hyaline Cartilage)

มีลักษณะค่อนข้างใสคล้ายกระจกและเป็นกระดูกอ่อนที่พบในร่างกายสัตว์มากที่สุด เช่น ที่บริเวณปลายของกระดูกที่ต่อกันเข้าเป็นข้อต่อ (Joint)

2.7.2.2 กระดูกอ่อนอิลาสติน (Elastic Cartilage)

มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับกระดูกอ่อนไฮอาลีน แต่มีสีออกเหลืองมีความขุ่นมัวมากกว่าและยืดหยุ่นได้มากกว่าไฮอาลีนพบได้ที่บริเวณโคนหู เป็นต้น

2.7.2.3 กระดูกอ่อนไฟโบร (Fibro Cartilage)

เป็นกระดูกอ่อนที่ประกอบด้วย เส้นใยคอลลาเจนในเมทริกซ์สูงที่สุดและมีความสำคัญในการทำให้เอ็นเชื่อมติดกับกระดูกได้ ซึ่งจะพบกระดูกอ่อนไฟโบรในช่องระหว่างข้อของกระดูกสันหลังและบริเวณสัน (Ridge) ของกระดูกสะบัก (Scapula) และกระดูกเชิงกราน (Pelvis)

2.7.3 กล้ามเนื้อโครงร่างและเส้นใยกล้ามเนื้อ

โดยทั่วไปสัตว์มีกล้ามเนื้อทั้งร่างกายประมาณร้อยละ 35-65 ของน้ำหนักซากสด กล้ามเนื้อของสัตว์อาจเรียกอีกอย่างว่า "กล้ามเนื้อโครงร่าง" ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ติดกับโครงกระดูกโดยตรงแต่มีบางส่วนติดอยู่กับเอ็น กระดูกอ่อน และหนัง เป็นต้น อวัยวะต่างๆ เช่น สะโพก ขาไหล่ ของร่างกายสัตว์จะประกอบด้วยกลุ่มของกล้ามเนื้อโครงร่างหลายกลุ่มรวมกันโดยมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทำหน้าที่ห่อหุ้มและยึดประสานทำให้กล้ามเนื้อโครงร่างคงรูปเป็นอวัยวะต่างๆ ดังนี้

2.7.3.1 กล้ามเนื้อ

เมื่อมองดูกล้ามเนื้อทั้งก้อนด้วยตาเปล่าจะเห็นว่าถูกห่อหุ้มด้วยชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นนอกที่เรียกว่า "อิพิไมเซียม (Epimysium)" โดยที่กล้ามเนื้อนั้นประกอบด้วยมัดกล้ามเนื้อหลายๆ มัดอยู่รวมกัน

2.7.3.2 มัดกล้ามเนื้อ (Muscle Bundle)

เป็นส่วนที่อยู่ถัดเข้าไปจากกล้ามเนื้อซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นกลางที่เรียกว่า "เพอริไมเซียม (Perimysium)" มีเส้นเลือดฝอยแทรกอยู่ระหว่างมัดกล้ามเนื้อถ้าตัดขวางมัดกล้ามเนื้อแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่ามัดกล้ามเนื้อประกอบไปด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ

2.7.3.3 เส้นใยกล้ามเนื้อ (Muscle Fiber)

เป็นส่วนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ ที่เรียกว่า "เอนโดไมเซียม (Endomysium)" ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อประกอบด้วยเส้นใยเล็กๆ ที่เรียกว่า "เส้นใยย่อย" อัดเรียงตัวกันอยู่เป็นจำนวนมาก

2.7.3.4 เส้นใยย่อย (Myofibril)

เป็นส่วนที่ประกอบกันเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อภายในเส้นใยย่อยมีเส้นใยฝอย (Myofilament) ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ เส้นใยฝอยชนิดหนาที่เรียกว่า "ไมโอซิน" และเส้นใยฝอยชนิดบางซึ่งเรียกว่า "แอกทิน" ในเส้นใยย่อยแต่ละเส้นมีเส้นใยไมโอซินและเส้นใยแอกทินซ้อนสลับกันไป

จึงทำให้เกิดเป็นแถบทึบสลับกับแถบโปร่งแสงไปตลอดความยาวของเส้นใยย่อย ดังนั้นเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงมองเห็นกล้ามเนื้อมีลักษณะเป็นลาย

2.7.4 เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) เป็นส่วนหนึ่งของเนื้อเยื่อที่กระจายอยู่ทั่วไปในกล้ามเนื้อมีหน้าที่ห่อหุ้มกล้ามเนื้อเชื่อมและยึดส่วนประกอบของกล้ามเนื้อให้ติดกันและยังเชื่อมกล้ามเนื้อให้ติดกับกระดูก องค์ประกอบและโครงสร้างส่วนใหญ่ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีลักษณะที่ไม่ใช่เซลล์ ดังนั้นจึงจะเรียกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันว่าเป็นสารนอกเซลล์ (Extracellular Substance) โดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันถูกแบ่งตามลักษณะโครงสร้างได้เป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะที่เป็นของเหลวเหนียวข้นและมีความหนืดสูงโดยมีไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญอยู่ในส่วนของเซลล์เส้นใยและสารระหว่างเซลล์ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารช่วยหล่อลื่นและยังเป็นเกราะป้องกันการแทรกซึมของเชื้อโรคภายนอก มักจะพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันลักษณะนี้ตาม ข้อ เอ็น และกระดูกอ่อนในร่างกาย ส่วนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอีกชนิดหนึ่งมีลักษณะโครงสร้างที่เป็นเส้นใยซึ่งมีรูปร่างแน่นอนอยู่นอกเซลล์ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในส่วนของกล้ามเนื้อถูกแบ่งเป็น 3 ชนิด โดยเรียงตามลำดับชั้นได้เป็น อิพิไมเซียม เพอริไมเซียม และเอนโดไมเซียม ตามลำดับ

2.7.4.1 อิพิไมเซียม (Epimysium)

เป็นเนื้อเกี่ยวพันที่อยู่รอบกล้ามเนื้อโครงร่างและห่อหุ้มมัดกล้ามเนื้อหลายๆ มัดให้อยู่รวมกันเป็นกล้ามเนื้อโครงร่าง

2.7.4.2 เพอริไมเซียม (Perimysium)

เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นที่ห่อหุ้มมัดกล้ามเนื้อและรวมเส้นใยกล้ามเนื้อเข้าเป็นมัดกล้ามเนื้อ

2.7.4.3 เอนโดไมเซียม (Endomysium)

เป็นเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งชั้นเอนโดไมเซียมมีเส้นเลือดฝอยอยู่เพื่อทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปสู่เซลกล้ามเนื้อโดยมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางส่วนทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของหลอดเลือดมีเส้นใยเรติคิวลาร์ (Reticular Fiber) ที่สานตัวกันเป็นร่างแหอยู่รอบๆ ช่วยทำให้เอนโดไมเซียมเชื่อมติดอยู่กับชั้นของซาร์โคเลมมาของเส้นใยกล้ามเนื้อได้ กล้ามเนื้อสัตว์ที่มีอายุมากจะเหนียวกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อยเนื่องจากสัตว์ที่มีอายุจะมีปริมาณตัวเชื่อมระหว่างโมเลกุลคอลลาเจนสูงกว่าจึงเป็นสาเหตุให้เนื้อเหนียวกว่าทั้งที่กล้ามเนื้อของสัตว์อายุน้อยจะมีปริมาณคอลลาเจนสูงกว่าก็ตาม เช่น เนื้อส่วนขาและสะโพกของหมูจะมีความเหนียวมากกว่าของลูกหมู เป็นต้น

2.7.5 เนื้อเยื่อไขมัน

เนื้อเยื่อไขมัน (Adipose Tissue) เป็นส่วนประกอบหลักที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งของกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมันมีหน้าที่หลายประการ ได้แก่ เป็นแหล่งสะสมของอาหารประเภทไขมันที่

สำคัญ เช่น กรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย เนื้อเยื่อไขมันยังเป็นแหล่งของสารอาหารที่ละลายได้ในไขมัน เช่น วิตามินที่ละลายในไขมัน เป็นต้น นอกจากนี้ไขมันที่อยู่บริเวณถัดจากชั้นของผิวหนังจะช่วยป้องกันการสูญเสียความร้อนของร่างกายช่วยทำให้ร่างกายสัตว์สามารถทนต่อสภาพอากาศซึ่งเปลี่ยนอยู่เสมอรวมทั้งช่วยป้องกันอันตรายให้กับอวัยวะภายในต่างๆ เช่น ไขมันที่ห่อหุ้มไต เป็นต้น มักพบเนื้อเยื่อไขมันในลักษณะที่เป็นไขมันใต้ผิวหนัง ไขมันแทรกอยู่ระหว่างมัดกล้ามเนื้อและไขมันในมัดกล้ามเนื้อซึ่งอยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้ง 3 ชนิด

2.7.5.1 ไขมันใต้ผิวหนัง (Subcutaneous Fat)

ในบางครั้งอาจพบอยู่เหนือชั้นของอิพิไมเซียมที่ห่อหุ้มกล้ามเนื้อ ไขมันในชั้นใต้ผิวหนังทำหน้าที่ช่วยป้องกันการสูญเสียความร้อนออกจากร่างกายสัตว์ ได้แก่ ส่วนมันแข็งของสุกร (Back Fat หรือ Subcutaneous Fat)

2.7.5.2 ไขมันแทรกอยู่ระหว่างมัดกล้ามเนื้อ (Intramuscular Fat or Seam Fat)

ไขมันที่ห่อหุ้มมัดกล้ามเนื้อเป็นชั้นไขมันที่อยู่ในชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพอริไมเซียม สามารถมองเห็นไขมันชั้นนี้ได้ชัดและสามารถแยกออกได้ง่าย เช่น ไขมันในช่องท้องและไขมันรอบๆ อวัยวะภายใน เป็นต้น

2.7.5.3 ไขมันในมัดกล้ามเนื้อ (Intramuscular Fat)

พบอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นเอนโดไมเซียมซึ่งห่อหุ้มเส้นใยกล้ามเนื้อทำให้มองเห็นชั้นของไขมันนี้แทรกกระจายอยู่ในมัดกล้ามเนื้อ จึงอาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “ไขมันแทรก (Marbling Fat)” เมื่อมองหน้าตัดของกล้ามเนื้อจะพบไขมันแทรกเป็นจุดขนาดเท่าไส้ดินสอขนาดเล็กกระจายตัวทั่วหน้าตัดของเนื้อ ปัจจุบันผู้บริโภคมักนิยมบริโภคไขมันแทรกปริมาณปานกลางจนถึงต่ำ

2.7.6 กล้ามเนื้อเรียบ

กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth Muscle) เป็นส่วนประกอบของเนื้อสัตว์ในปริมาณต่ำเส้นใยกล้ามเนื้อเรียบมีรูปร่างยาวเป็นรูปกระสวยซึ่งมีความยาว 0.2-4.0 มิลลิเมตร เมื่อส่องดูเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจะเห็นว่ามีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางของเส้นใยกล้ามเนื้อ ส่วนเส้นใยแอกทินและไมโอซินของกล้ามเนื้อเรียบจะอยู่รวมกันอย่างไม่เป็นระเบียบและมองเห็นเป็นรูปร่างไม่ชัดเจนจึงเรียกกล้ามเนื้อนี้ว่า “กล้ามเนื้อเรียบ” ซึ่งสามารถพบกล้ามเนื้อเรียบได้ในบริเวณผนังของเส้นเลือด ผนังลำไส้ และพบกล้ามเนื้อเรียบอยู่ร่วมกับกล้ามเนื้อโครงร่างในอวัยวะบางชนิด ได้แก่ ลิ้นและกระเพาะอาหาร

2.7.7 กล้ามเนื้อหัวใจ

กล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac Muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่มีคุณสมบัติที่พิเศษและแตกต่างจากกล้ามเนื้ออื่น กล้ามเนื้อหัวใจมีการทำงานหรือเต้นเป็นจังหวะตลอดเวลาไม่หยุดตั้งแต่เริ่มมีชีวิตจนกระทั่งสัตว์ตาย กล้ามเนื้อหัวใจนี้มีส่วนที่คล้ายกับทั้งกล้ามเนื้อโครงร่างและกล้ามเนื้อเรียบโดยมีนิวเคลียสอยู่ในใจกลางเซลล์และทำงานนอกเหนือการควบคุมของสมองเช่นเดียวกับกล้ามเนื้อเรียบ

แต่มีส่วนที่คล้ายกับกล้ามเนื้อโครงร่างโดยมีเส้นใยฝอยแอกทินและไมโอซินที่เรียงตัวสลับอยู่ด้วยกัน จึงทำให้มีความลายคล้ายกับในเส้นใยของกล้ามเนื้อโครงร่าง เส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจมีรูปร่างเฉพาะที่เป็นกิ่งสาขาโดยจะประกอบด้วยเส้นใยลำต้น ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อโครงร่างและส่วนของเส้นใยที่เป็นสาขาก็มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าเส้นใยลำต้น กล้ามเนื้อหัวใจประกอบด้วยเส้นใยฝอยแอกทินและไมโอซินเรียงกันเป็นกลุ่มหนาแน่นซึ่งมองเห็นได้ชัดกว่าในกล้ามเนื้อเรียบและเมื่อมองตามความยาวแล้วจะเห็นว่ามีความลายปรากฏอยู่จึงอาจเรียกกล้ามเนื้อหัวใจว่าเป็นกล้ามเนื้อลายได้ เมื่อเปรียบเทียบกล้ามเนื้อโครงร่างหรือกล้ามเนื้อลาย กล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อหัวใจจะสังเกตเห็นลักษณะที่คล้ายกันและแตกต่างกัน

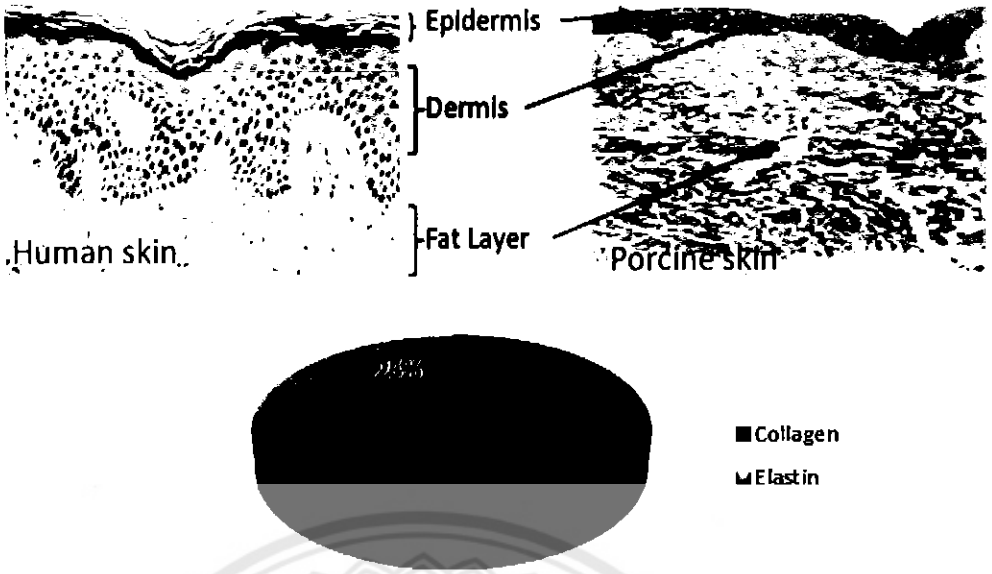
2.7.8 ระบบเส้นเลือดและระบบประสาท

ระบบเส้นเลือด (Blood System) เป็นทางเดินของเส้นเลือดที่ไปสู่กล้ามเนื้อโดยการผ่านไปตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอิพิไมเซียมและเพอริไมเซียม เส้นเลือดจะแตกแขนงออกเป็นเส้นเลือดฝอยแผ่กระจายไปตามส่วนต่างๆ ของเส้นใยกล้ามเนื้อโดยมีเส้นเลือดแดง (Artery) เป็นทางนำอาหาร น้ำและออกซิเจนมาสู่เส้นใยกล้ามเนื้อและเส้นเลือดดำ (Vein) โดยจะทำหน้าที่ขนถ่ายของเสียออกจากเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยระบบประสาท (Nervous System) เป็นส่วนของเนื้อเยื่อที่เชื่อมโยงติดต่อกับกล้ามเนื้อต่างๆ ภายในร่างกายเพื่อควบคุมการทำงานจึงอาจจะถูกเรียกระบบประสาทว่า “เนื้อเยื่อประสาท” เนื้อเยื่อประสาทมีประมาณร้อยละ 1 แม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยแต่จัดเป็นส่วนที่มีผลต่อคุณภาพของเนื้อมากที่สุดโดยเฉพาะระหว่างขั้นตอนการทำให้สัตว์สลบรวมทั้งในขั้นตอนการแทงคอเอาเลือดออกเช่นกัน

2.7.9 เนื้อเยื่อผิวหนัง

เนื้อเยื่อผิวหนัง (Epithelial Tissue) พบที่ผิวนอกของร่างกายสัตว์ส่วนในซากพบที่หลอดเลือด ท่อน้ำเหลือง อวัยวะภายใน เป็นต้น เนื้อเยื่อผิวหนังทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิการป้องกันการสูญเสียความร้อน การขับถ่ายของเสียออกจากร่างกายและการรับความรู้สึก เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังจะมีรูปร่างหลายแบบ ซึ่งได้แก่ แบบแผ่นบาง (Squamous) แบบลูกบาศก์ (Cuboidal) และแบบทรงสูง (Columnar) แตกต่างกันตามหน้าที่ของเนื้อเยื่อเหล่านั้น

ผิวหนังของหมูจะห่อหุ้มร่างกายไว้ทั้งหมด ซึ่งทำหน้าที่ปกป้องอวัยวะต่างๆ ที่อยู่ใต้ลงไปจากความร้อน แสง การติดเชื้อ และสภาพแวดล้อมทั้งหลาย นอกจากนี้มันยังทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ เป็นที่กักเก็บน้ำและไขมัน มีปลายประสาทรับรู้ความรู้สึกและป้องกันการสูญเสียน้ำป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ผิวหนังทั่วทั้งร่างกายจะมีความแตกต่างกันไปทั้งสี ความหยาบละเอียด และความหนา ซึ่งผิวหนังจะประกอบไปด้วยชั้นต่างๆ ซึ่งแต่ละชั้นก็มีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป ซึ่งการเปรียบเทียบผิวหนังของคนกับผิวหนังของหมูจะแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงการเปรียบเทียบผิวหนังของคนกับผิวหนังของหมู

ที่มา: ชัยณรงค์ คันธพนิต (2529)

2.7.9.1 ชั้นอีพิเดอมิส (Epidermis)

เป็นชั้นหนังกำพร้าจัดเป็นผิวหนังชั้นนอกสุดส่วนใหญ่จะประกอบด้วยโปรตีนที่ช่วยทำให้โครงสร้างผิวแข็งแรงและมีความยืดหยุ่น ซึ่งผิวหนังชั้นนี้จะทำหน้าที่ป้องกันส่วนต่างๆ ภายในร่างกาย ป้องกันสิ่งแปลกปลอมภายนอกไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังป้องกันการสูญเสียของน้ำออกจากร่างกายด้วย เป็นชั้นที่มีคอลลาเจนปะปนอยู่แต่มีในปริมาณที่ไม่มากเท่าชั้นหนังแท้

2.7.9.2 ชั้นเดอมิส (Dermis)

เป็นชั้นที่อยู่ตรงกลางจัดว่าเป็นชั้นหนังแท้ซึ่งชั้นนี้จะมีหลอดเลือดขนาดเล็กมาหล่อเลี้ยง ท่อน้ำเหลือง รากขน ต่อมเหงื่อ ซึ่งผิวหนังในชั้นนี้จะประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนเซลล์ไฟโบรบลาส (Fibroblast) ซึ่งเป็นตัวที่สร้างเส้นใยคอลลาเจนและอีลาสติน (Elastin) ซึ่งเส้นประสาทชั้นเดอมิสนี้จะถูกยึดเข้าหากันด้วยเส้นใยคอลลาเจนจึงทำให้ผิวหนังชั้นนี้มีปลายประสาทรับความรู้สึกเจ็บและการสัมผัสได้

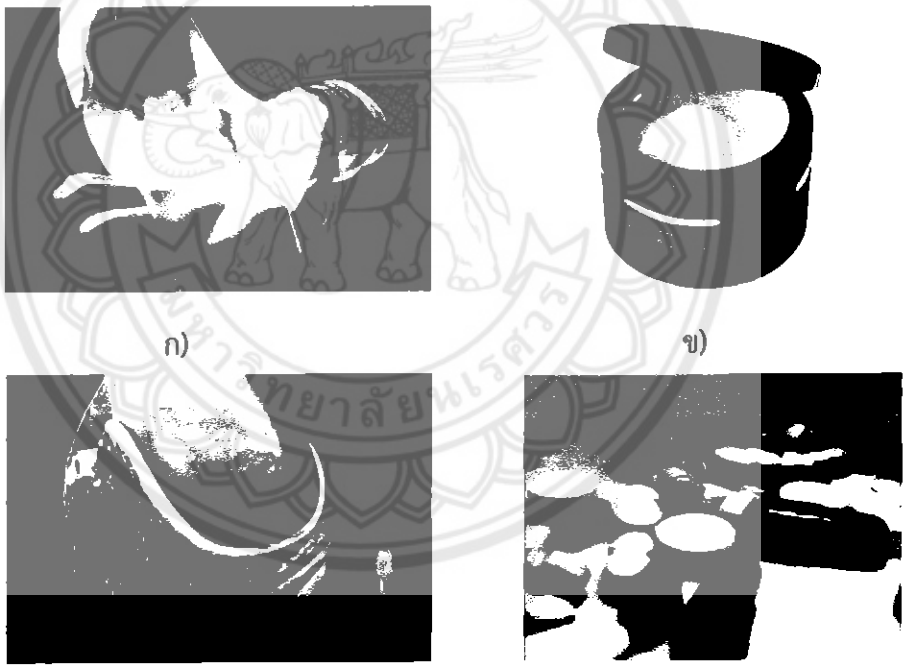
2.7.9.3 ชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (Subcutaneous Fat Layer)

เป็นชั้นที่อยู่ลึกที่สุดผิวหนังชั้นนี้จะมีเครือข่ายของเส้นใยคอลลาเจนและมีเซลล์ไขมันประปนอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งเซลล์ไขมันเหล่านี้จะช่วยในการเก็บสะสมพลังงานความร้อนไม่ให้สูญเสียออกนอกร่างกายและช่วยปกป้องร่างกายด้วยการดูดซับแรงกระแทกจากภายนอก แต่ในหมูชั้นนี้เป็นชั้นที่พบคอลลาเจนน้อยที่สุด เพราะเนื่องจากมีส่วนของชั้นไขมันปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก

2.8 การประยุกต์ใช้คอลลาเจน [7]

ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในหลายๆ ไม่ว่าจะเป็นทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร ด้านการแพทย์ รวมไปถึงความงาม เป็นต้น

การนำคอลลาเจนมาใช้ประโยชน์มีทั้งแบบไม่เสื่อมสภาพ (Non-Denatured Collagens) และแบบเสื่อมสภาพ (Denatured Collagens) เช่น คอลลาเจนแบบไม่เสื่อมสภาพจะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านเครื่องสำอาง ดังรูปที่ 2.4 ข) ด้านการแพทย์ เช่น ผิวหนังเทียม ดังรูปที่ 2.4 ก) และกระดูกเทียมดังรูปที่ 2.4 ค) รวมถึงทางด้านเภสัชกรรม แสดงดังรูปที่ 2.4 ง) ส่วนคอลลาเจนแบบเสื่อมสภาพ (เจลาติน คอลลาเจนไฮโดรไลเซต) จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านอาหารและด้านการแพทย์ ซึ่งการประยุกต์ใช้คอลลาเจนในด้านการแพทย์และด้านเภสัชกรรมจะหมายความรวมถึงการรักษาโรคความดันโลหิตสูง กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (Urinary Incontinence) และโรคข้อกระดูกอักเสบ (Osteoarthritis) อีกทั้งยังใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) และใช้ยับยั้งการเกิดโรคอ้วนและโรคแทรกซ้อนในผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน



ก) ข) ค) ง)

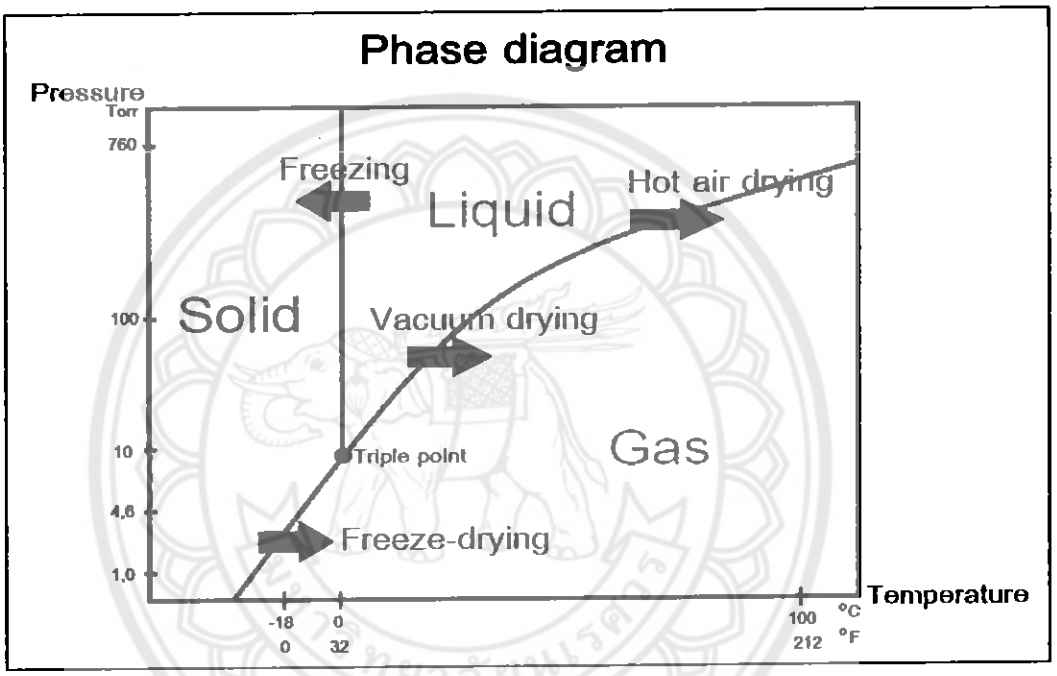
รูปที่ 2.4 ตัวอย่างการประยุกต์การใช้งานของคอลลาเจน ก) ผิวหนังเทียม ข) ทางด้านเครื่องสำอาง ค) กระดูกเทียม ง) ทางด้านเภสัชกรรม

2.9 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) [15]

การสกัดคอลลาเจนเมื่อทำการสกัดเสร็จแล้ว จะได้คอลลาเจนรวมกับสารละลายกรดอะซิติกและเอนไซม์เปปซินที่ใช้ในการสกัด จึงจำเป็นที่จะต้องทำการแยกกรดอะซิติกและเอนไซม์ออกจากคอลลาเจนที่สกัดได้ จึงมีการนำเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็งมาประยุกต์ใช้ในการแยกกรดอะซิติก

และเอนไซม์ออกจากคอลลาเจนที่สกัดได้ออก ทำให้ไม่ส่งผลต่อโครงสร้างมาตรฐานของคอลลาเจนที่สกัดได้และยังเป็นการรักษาสมบัติและโครงสร้างของคอลลาเจนไม่ให้เสียสภาพจากกระบวนการแยก

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dehydration หรือ Lyophilization) หมายถึงการทำแห้ง (Dehydration) ด้วยการการแช่เยือกแข็ง (Freezing) ให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อน แล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิด (Sublimation) เป็นไอ ด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำ (ที่อุณหภูมิเท่ากับหรือต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส น้ำแข็งระเหิดที่ความดันเท่ากับ 4.7 มิลลิเมตรปรอทหรือต่ำกว่า) ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แผนภาพ Phase Diagram
ที่มา: ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล (2547)

ขั้นตอนเบื้องต้นสำหรับการผลิตอาหารด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ก็เหมือนกับการผลิตอาหารแห้งโดยทั่วไป คือ เริ่มจากการเตรียมวัตถุดิบให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม เช่น การล้าง การปอกเปลือก การลดขนาดจากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการหลักซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

2.9.1 การแช่เยือกแข็ง (Freezing)

การแช่เยือกแข็ง (Freezing) จะทำโดยการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Freezing Point) เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice Crystal Formation) อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง (Freezing Rate) ควรเป็นการแช่แข็งแบบเร็ว เพื่อให้เกิดผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก การแช่เยือกแข็งแบบเร็ว ที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นเป่า (Air Blast Freezing) การแช่เยือกแข็งแบบไครโอเจน (Cryogenic Freezing) และการแช่เยือกแข็งแบบจุ่มลงในของเหลวเย็นจัด (Immersion Freezing) เป็นต้น

2.9.2 การทำแห้งขั้นต้น (Primary Drying)

การทำแห้งขั้นต้น (Primary Drying) เป็นการลดปริมาณน้ำ (Dehydration) โดยจะมีการระเหิด น้ำแข็งให้เป็นไอโดยการลดความดันบรรยากาศ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอออกจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระดับของสุญญากาศ (Vacuum) ควรอยู่ต่ำกว่า 132 ปาสคาล และ 132 เมกะปาสคาล ตามลำดับ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งจึงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์

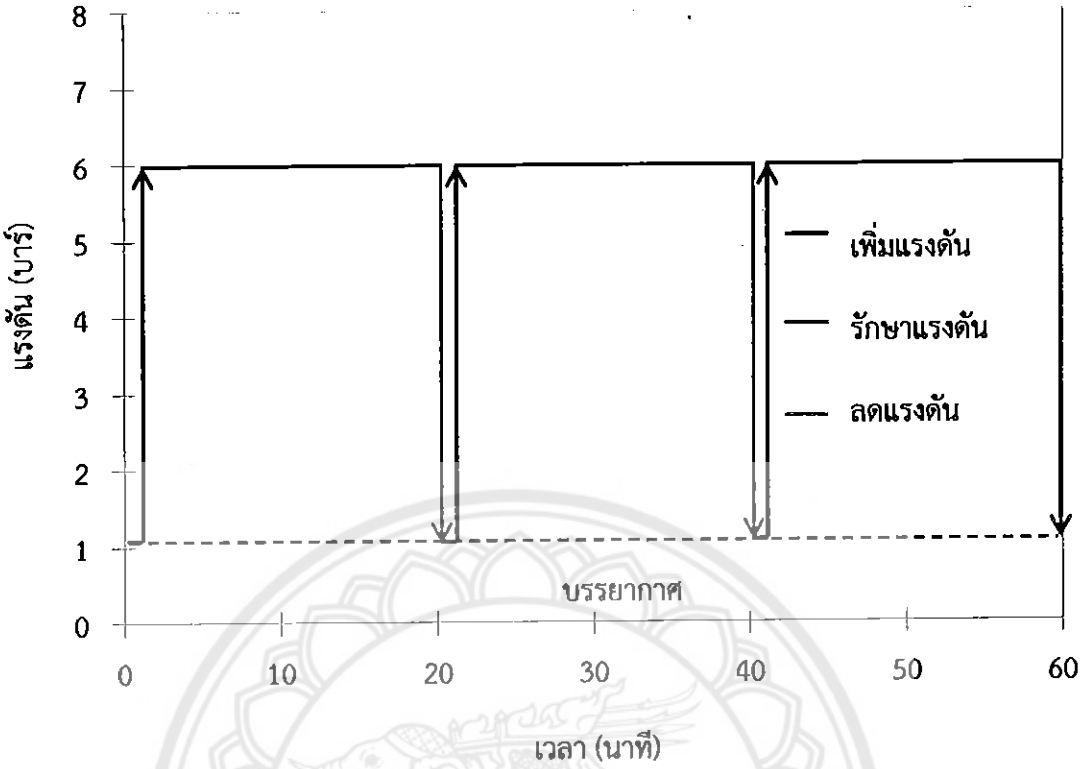
การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง (Ice Layer) จะเริ่มจากชั้นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ระเหิดไปเป็นไอทำให้บริเวณนี้กลายเป็นชั้นแห้ง (Dry Layer) จากนั้นเป็นการระเหิดของชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ ระเหิดผ่านชั้นแห้ง ออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาการระเหิด ขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

2.9.3 การทำแห้งขั้นที่สอง (Secondary Drying)

การทำแห้งขั้นที่สอง (Secondary Drying) เมื่อการทำแห้งขั้นต้น เสร็จสมบูรณ์ น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นหลงเหลืออยู่ จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพื่ออุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออกถึงระดับความชื้นที่ปลอดภัยสำหรับการเก็บรักษา

2.10 เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique)

จากการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงในการสกัดคอลลาเจนจำเป็นต้องทราบว่าเพราะเหตุใดการใช้วิธีนี้จึงช่วยในการสกัดคอลลาเจนได้มากขึ้น เนื่องจากเนื้อเยื่อของหนังหมูที่ประกอบเป็นเซลล์นั้นมีส่วนผนังเซลล์อยู่ชั้นนอกสุดซึ่งจะเป็นตัวต้านทาน การแทรกซึมของสารที่ใช้ในการสกัดได้ การสกัดจะประกอบไปด้วยกระบวนการแพร่ผ่านพื้นผิวของตัวทำละลายและการนำคอลลาเจนออกมา การอัดคลายแรงดันแบบช่วงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านเข้าไปในผิวหนังหมูของเอนไซม์และกรดอะซิติกได้มากขึ้นและเมื่อลดแรงดันจะทำให้สารละลายที่ใช้สกัดสามารถนำคอลลาเจนออกมาจากหนังหมูและเมื่อมีการเพิ่มความดันอีกครั้งก็จะสามารถทำให้สารละลายที่ยังอยู่รอบๆ ของหนังหมูสามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในหนังหมูได้อีกครั้ง โดยการอัดคลายแรงดันแบบช่วงจะกำหนดแรงดันที่ใช้ในการอัดคลายและจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันเป็นรอบต่อชั่วโมง ยกตัวอย่างเช่น แรงดันที่ใช้ในการอัดคลายแรงดันที่ 6 บาร์ การอัดคลายแรงดันที่จำนวน 3 รอบต่อชั่วโมง (1 รอบต่อ 20 นาที) ซึ่งสามารถทำได้โดยให้แรงดันแก่ระบบ จากบรรยากาศจนกระทั่งแรงดันมีค่าเท่ากับ 6 บาร์ และรักษาแรงดันให้คงที่เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจะทำการลดแรงดันของระบบอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งแรงดันกลับเข้าสู่บรรยากาศ ซึ่งจะถือว่าครบ 1 รอบ และทำการเพิ่มแรงดันของระบบที่ 6 บาร์อีกครั้ง ทำจนกว่าจะครบ 3 รอบ หรือจำนวนรอบที่ต้องการ โดยสามารถดูรูปประกอบได้ ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันที่ 6 บาร์ ที่จำนวน 3 รอบต่อชั่วโมง

2.11 การวิเคราะห์ Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) มีประโยชน์มากสำหรับการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ทั้งที่เป็นของแข็ง ของเหลวและแก๊ส FT-IR ใช้ในงานที่ต้องการความรวดเร็วและความไวสูง โดยเครื่องตรวจวัด FT-IR จะเป็นแบบ Interferometer โดย Interferometer จะแยกลำรังสีออก ทำให้เกิด Path Difference ขึ้นระหว่างลำแสงแล้วทำการรวมสัญญาณการแทรกสอดโดยจะเป็นฟังก์ชันกับ Path Difference ซึ่งเครื่องมือตรวจวัดการทำงานโดยเครื่องมือหลักๆ จะถูกออกแบบมาอย่างง่ายๆ ซึ่งรังสีอินฟราเรดจากแหล่งกำเนิดนั้นจะถูกฉายไปยัง Interferometer ซึ่งตัวที่นิยมใช้ คือ Michelson Interferometer ซึ่งประกอบด้วยกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ กระจกที่ตรึงอยู่กับที่ โดยทั้งสองจะตั้งฉากซึ่งกันและกันและตัวแยกแสงซึ่งเป็นอุปกรณ์กึ่งสะท้อนแสง โดยส่วนใหญ่ทำมาจากการนำฟิล์มบางของเจอร์มาเนียมวางลงบน KBr ที่ตัวแยกลำแสงรังสีครึ่งหนึ่งจะทะลุผ่านไปยังกระจกที่ตรึงอยู่กับที่และอีกครึ่งหนึ่งจะสะท้อนไปยังกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ หลังจากนั้นลำรังสีก็จะสะท้อนจากกระจกกลับมารวมกันที่ตัวแยกแสง เกิดการแทรกสอดขึ้น หลังจากนั้นลำรังสีก็จะผ่านไปยังตัวอย่างและในที่สุดก็จะตกลงบนเครื่องตรวจวัด

ข้อดีและข้อจำกัดของ FT-IR ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและมีความไวสูง (โดยส่วนใหญ่จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 1-5 นาที) โดยจะมีอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนได้ค่า (Signal-To-Noise; S/N) ที่ต่ำโดยอัตรา S/N จะแปรผันกับรากที่สองของปริมาณสัญญาณที่ตรวจวัด

ได้ทั้งหมด ความไวของเครื่องตรวจวัดสามารถเพิ่มขึ้นได้ด้วยการเพิ่ม S/N ร่วมกับการเพิ่มจำนวนรอบของสแกน โดยจะมีการใช้ Circular Optical Aperture แทนที่ Entrance Slit ทำให้ลำรังสีมีขนาดมากกว่าแบบ Dispersive ถึง 75-100 เท่า ซึ่งจะมีกำลังแสงสูงขึ้น เหมาะสำหรับตัวอย่างหรือเทคนิคบางเทคนิคที่มีข้อจำกัดของกำลังแสง นอกจากนี้ FT-IR ยังให้ประสิทธิภาพในการแยกสูงรวมทั้งมีความถูกต้องไม่ต่ำกว่า 0.01 ซม$^{-1}$ มีกลไกการทำงานที่ง่าย แต่ FT-IR มีข้อจำกัดในการเตรียมตัวอย่างบางเทคนิคที่ต้องใช้สารละลายที่ยินยอมให้รังสีทะลุผ่านได้ โดยแต่ละในตัวอย่างนั้นจะต้อง Active ในช่วงของอินฟราเรด นอกจากนี้เครื่องมือที่ใช้ราคาค่อนข้างสูงและค่าใช้จ่ายการบำรุงรักษาสูง [24]

2.12 การสำรวจเอกสารงานวิจัย

ในปี ค.ศ. 1994 P. Semal และ R. Orban [16] ได้ศึกษาถึงการสกัดคอลลาเจนจากกระดูก ซึ่งกระดูกที่นำมาศึกษาในการสกัด คือ กระดูกคน กระดูกกวางเรนเดียร์และกระดูกสัตว์โบราณประเภทม้า (อายุ 47,000 ปี) โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ตอน นั่นคือ สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 2 มิลลิลิตรต่อผงกระดูกน้ำหนัก 200 มิลลิกรัม โดยจะมีการใช้การเหวี่ยงแยกและไม่ใช้การเหวี่ยงแยก จากผลการศึกษาพบว่ากระดูกมนุษย์สามารถให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่น นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้ร่วมกับการเหวี่ยงแยกตะกอนร่วมกับการสกัดสามารถเพิ่มปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

ในปี ค.ศ. 2003 E. Skierka และคณะ [17] ได้ทำการศึกษาการแยกคอลลาเจนออกจากผิวหนังของปลาค็อด (Cod) โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกและกรดซิตริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:4 และ 1:6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ การสกัดจะถูกดำเนินการเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าสกัดที่อัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยที่ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มีประมาณร้อยละ 85 และเมื่อมีการเพิ่มอัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกมีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดซิตริกมีปริมาณคงที่ไม่เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนที่ใช้สกัด

ในปี ค.ศ. 2004 J.H. Muyonga และคณะ [18] จากการทำการศึกษางานวิจัยดังกล่าวได้มีการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา Nile Perch ในสองช่วงอายุ คือ ช่วงอายุแรกเป็นของปลาที่ยังไม่โตเต็มวัยกับช่วงอายุของปลาที่โตเต็มวัย โดยจะใช้กรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วนน้ำหนักของผิวหนังปลา 1 กรัม ต่อกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ จากการศึกษาพบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาที่ยังไม่โตเต็มวัยได้ปริมาณสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนังปลาที่โตเต็มวัยแล้ว โดยปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลายังไม่โตเต็มวัยได้ปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้ร้อยละ 63.1 และหนังปลาที่โตเต็มวัยได้ปริมาณคอลาเจนที่สกัดได้ร้อยละ 58.7 ซึ่งจะเห็นได้ชัดว่าช่วงอายุของปลาที่มีอายุน้อยกว่าจะสามารถจะมีปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้มากกว่าช่วงอายุของปลาที่มีมากกว่า

ในปี ค.ศ. 2005 N. Aukkanit และคณะ [12] การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกุดสด ทำโดยใช้กรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นตกตะกอนแยกคอลลาเจนด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ โดยทำการสกัดที่สัดส่วนหนังต่อกรด (กรัมต่อมิลลิลิตร) 1:10 1:15 1:20 และ 1:25 พบว่าเมื่อสัดส่วนของกรดเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณผลได้ (Yield) ลดลง จึงเลือกใช้สัดส่วน 1:10 ในการสกัดคอลลาเจนที่อุณหภูมิต่างๆ (4 10 20 และ 28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะพบว่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณผลได้มากที่สุด คือ 439.32 มิลลิกรัมต่อกรัมหนังปลาสดที่หักลบความชื้น โดยยังมีส่วนของหนังปลาที่เหลืออยู่ 544.60 มิลลิกรัมต่อกรัม หนังปลาสดที่หักลบความชื้น คอลลาเจนที่สกัดได้เป็นคอลลาเจน Type I การสกัดคอลลาเจนที่อุณหภูมิสูง (20 และ 28 องศาเซลเซียส) จะพบเปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เนื่องจากเกิดการย่อยโดยกรดและเอนไซม์อย่างรวดเร็ว จึงไม่สามารถที่จะตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ ทำให้ปริมาณผลได้ต่ำ

ในปี ค.ศ. 2009 M. Sadowska และคณะ [19] ได้ทำการศึกษาผลความแตกต่างของกรดและเอนไซม์เพปซินในการสกัดคอลลาเจนจากปลาค็อดโดยใช้สารละลายกรดซิตริก แลคติก และอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ดำเนินการสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ในอัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากการศึกษาพบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากกรดอะซิติกและกรดแลคติกให้ผลได้สูงสุดร้อยละ 90 คอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดซิตริกให้ซึ่งได้ผลร้อยละ 60 และคอลลาเจนที่ถูกสกัดได้จากสารละลายโซเดียมคลอไรด์นั้นให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ร้อยละ 18 ซึ่งจากนั้นสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์ เปปซินร่วมกับกรด ผลที่ได้ คือ การสกัดคอลลาเจนจากโซเดียมคลอไรด์และกรดซิตริกได้ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยกรดเพียงอย่างเดียวร้อยละ 40 และร้อยละ 20 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์คอลลาเจนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) จะพบว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติกและกรดแลคติกจะให้คอลลาเจนที่มีโครงสร้างโมเลกุลครบ 3 สาย (Triple Helix) ส่วนคอลลาเจนที่สกัดจากเอนไซม์เพปซินร่วมกับโซเดียมคลอไรด์และกรดซิตริกทำให้โครงสร้างโมเลกุล 3 สาย ของคอลลาเจนถูกทำลายหรือผิดรูปไปจากเดิม

ในปี ค.ศ.2007 I. Prasertsung และคณะ [5] ได้ทำการวิจัยในเรื่องการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมูด้วยกระบวนการการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับเอนไซม์โดยศึกษาถึงผลกระทบของชนิดเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) และดิสเปส II (Dispase II) และสภาวะการเพิ่มความดันแบบช่วงที่ส่งผลต่อการขจัดเซลล์ในผิวหนังหมู จากผลการศึกษาจะพบว่าเมื่อมีการเพิ่มความดันแบบช่วงทำให้เวลาที่ใช้ในการแช่ในเอนไซม์ลดลง เนื่องจากสารละลายเอนไซม์สามารถแทรกซึมเข้าไปในหนังหมูได้ดีขึ้นส่งผลให้การกำจัดเซลล์ออกจากหนังหมูสามารถทำได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนเอนไซม์ที่เตรียมใหม่ลงไปในกระบวนการขจัดเซลล์ส่งผลให้ปริมาณของการขจัดเซลล์มากขึ้น เนื่องจากไม่มีการยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้นจากเซลล์ที่ถูกกำจัดออกจาก

งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ในโครงสร้างของหนังหมูได้

ในปี ค.ศ.2007 ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์ และคณะ [20] ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง พบว่าเกล็ดของปลากะพงแดงมีองค์ประกอบหลัก คือ โปรตีน (ร้อยละ 47.87 ของน้ำหนักแห้ง) และเถ้า (ร้อยละ 49.01 ของน้ำหนักแห้ง) เพื่อให้ได้เกล็ดปลาที่มีปริมาณโปรตีนสูง จึงทำการศึกษาหาวิธีการกำจัดแคลเซียมและพบว่าการแช่เกล็ดปลาใน 1.2 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะทำให้มีปริมาณเถ้าที่เหลืออยู่ในเกล็ดปลาน้อยกว่าร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง นำเกล็ดปลาที่กำจัดเถ้าแล้วมาศึกษาขั้นตอนการสกัดคอลลาเจน ซึ่งประกอบด้วยการสกัด 2 ขั้นตอน คือ การสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อน ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน โดยศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดทั้ง 2 ขั้นตอน พบว่าที่อุณหภูมิและเวลาในการสกัดทั้ง 2 ขั้นตอน มีผลต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์และปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจน โดยวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงสุด (ร้อยละ 91.76 ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห้งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม) คือ การสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งผล SDS-PAGE ของสารสกัดคอลลาเจนจากการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลาที่สกัดได้ เป็นคอลลาเจน Type I ซึ่งมีองค์ประกอบของหน่วยย่อย $\beta\alpha1$ และ $\alpha2$ จากงานวิจัยพบว่าวิธีการสกัดคลอเจนที่ได้ปริมาณมากสุด คือ วิธีการสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

ในปี ค.ศ. 2009 F.Y. Cheng และคณะ [21] ศึกษาผลความแตกต่างของการสกัดคอลลาเจนที่มีสารเมลานินจากหนังเท้าไก่ด้วยเอนไซม์ร่วมกับกรด 4 ชนิดนั่น คือ กรดอะซิติก กรดซิตริก กรดไฮโดรคลอริก และกรดแลคติก โดยที่จะทำการวิเคราะห์สารที่ทำการสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis) และ UV-Vis (200-400 นาโนเมตร) ซึ่งการวิเคราะห์องค์ประกอบของคอลลาเจนที่สกัดได้ พบว่ามีปริมาณเมลานินปะปนอยู่ด้วย จากผลการวิเคราะห์สรุปว่ากรดอะซิติกให้ผลสูงสุด คือ ในปริมาณคอลลาเจน 516.6 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยจะมีปริมาณเมลานินร้อยละ 7.3

ในปี ค.ศ.2009 D. Li และคณะ [4] ได้ศึกษาวิจัยเรื่องการฉายรังสีอัลตราโซนิคในเอนไซม์เพื่อการสกัดคอลลาเจน ได้ศึกษาผลของการฉายแสงอัลตราโซนิคที่มีผลต่อการสกัดคอลลาเจนจากเส้นเอ็นวัว ผลการศึกษาพบว่าการใช้วิธีการฉายแสงอัลตราโซนิคจะเพิ่มปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้และจะช่วยลดระยะเวลาในการสกัดได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธีการสกัดด้วยเปปซินเพียงอย่างเดียว ซึ่งการปรับปรุงด้วยวิธีนี้จะส่งเสริมให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีขึ้นและแก้ปัญหาเรื่องสารตั้งต้นของคอลลาเจนได้ เนื่องจากการฉายแสงอัลตราโซนิคจะทำหน้าที่แยกเอนไซม์เปปซินและทำหน้าที่เปิดเส้นใยของคอลลาเจน ดังนั้นการย่อยสลายเอนไซม์ด้วยน้ำจะทำได้สะดวกขึ้นการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการฉายแสงอัลตราโซนิคแบบอ่อนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดคอลลาเจนด้วยเปปซินได้ดีขึ้นโดยไม่ทำให้คุณภาพของคอลลาเจนเสื่อมลง

ในปี ค.ศ. 2011 P. Singh และคณะ [22] ได้ทำการค้นคว้าวิจัยเรื่องการจำแนกลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังของปลาดุก ได้ศึกษาถึงความแตกต่างและศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของ Acid Soluble Collagen (ASC) และ Pepsin Soluble Collagen (PSC) จากผิวหนังของปลาดุก ซึ่งจากการศึกษาพบว่าคอลลาเจนที่ละลายในกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายในน้ำย่อย (PSC) จะมีปริมาณ คอลลาเจนที่สกัดได้ คือ ร้อยละ 5.1 และร้อยละ 7.1 ตามลำดับ ซึ่งขึ้นอยู่กับน้ำหนักของหนังปลาดุกโดยมีการนำเครื่อง FT-IR มาตรวจสอบโครงสร้างคอลลาเจนจากการสกัด พบว่าคอลลาเจนที่ได้นั้นไม่มีความเสื่อมสภาพทั้งคอลลาเจนที่ละลายในกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายในน้ำย่อย (PSC) นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ขั้นตอนของการทดลองซึ่งพบว่าในการใช้กรดการสกัดและใช้เอนไซม์เปปซินการสกัดจะได้ประสิทธิภาพที่ดีเมื่อค่าพีเอช มากกว่า 4 และที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงกว่าร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อนำปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ทั้ง 2 วิธี (คอลลาเจนที่ละลายในกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายในน้ำย่อย (PSC)) ไปตรวจสอบทางความร้อนจะพบว่าอุณหภูมิสูงสุดที่ทำให้คอลลาเจนมีความเสื่อมสภาพ คือ คอลลาเจนที่ทำการสกัดโดยใช้กรดจะมีความเสื่อมสภาพที่อุณหภูมิ 39.3 องศาเซลเซียส และคอลลาเจนที่ได้ทำการสกัดโดยใช้เอนไซม์จะมีความเสื่อมสภาพที่อุณหภูมิ 39.6 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าการสกัดคอลลาเจนจากผิวหนังของปลาดุกโดยวิธี Pepsin Soluble Collagen (PSC) จะทำให้ได้คอลลาเจนที่มีปริมาณมากกว่าการสกัดคอลลาเจนโดยวิธี Acid Soluble Collagen (ASC)

ในปี ค.ศ.2012 S. Vairamani และคณะ [23] ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องการสกัดและลักษณะโครงสร้างทางกายภาพและประเภทของคอลลาเจนจากผิวหนังชั้นนอกของปลาหมึกกระดองก้นไหม้ โดยพบว่าคอลลาเจนที่ละลายในกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายในน้ำย่อย (PSC) ที่ถูกสกัดจากผิวหนังชั้นนอกของปลาหมึกกระดองก้นไหม้ โดยที่ปริมาณของคอลลาเจนที่ละลายในกรด (ASC) จะอยู่ในระดับที่น้อยกว่า (ร้อยละ 0.58 โดยน้ำหนักแห้ง) เมื่อเทียบกับที่ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายในน้ำย่อย (PSC) (ร้อยละ 16.23 โดยน้ำหนักแห้ง) ส่วนปริมาณของโปรตีนในคอลลาเจนที่ละลายในกรด (ASC) และปริมาณของโปรตีนในคอลลาเจนที่ละลายในน้ำย่อย (PSC) สามารถคำนวณได้เป็นร้อยละ 20.24 และร้อยละ 69.56 ตามลำดับ (คิดที่น้ำหนักแห้ง) จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางความร้อน พบว่าคอลลาเจนที่ละลายในกรด (ASC) ทนได้ถึง 75.93 องศาเซลเซียส ซึ่งในขณะที่คอลลาเจนที่ละลายในน้ำย่อย (PSC) ทนได้ 75.05 องศาเซลเซียส โดยที่การศึกษาโครงสร้างของทั้ง คอลลาเจนที่ละลายในกรด (ASC) และคอลลาเจนที่ละลายในน้ำย่อย (PSC) ศึกษาโดยการสแกนโดยเครื่อง Scan Electron Microscopy โดยจากงานวิจัยพบว่ากลุ่มคอลลาเจนที่ละลายในสารละลายกรดสามารถทนอุณหภูมิได้สูงว่ากลุ่มคอลลาเจนที่ละลายในเอนไซม์หรือน้ำย่อย

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 หนังหมูสดจากหมูช่วงอายุ 3-6 เดือน

3.1.2 เอนไซม์เปปซิน (จากกระเพาะของสุกร) ยี่ห้อ FlukaBiochemika

3.1.3 อะซีโตนยี่ห้อ RCI Labscan Limited Grade AR

3.1.4 กรดอะซิติกยี่ห้อ QRëC Grade AR

3.1.5 น้ำกลั่น

3.1.6 ผ้าขาวบาง

3.1.7 เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized)

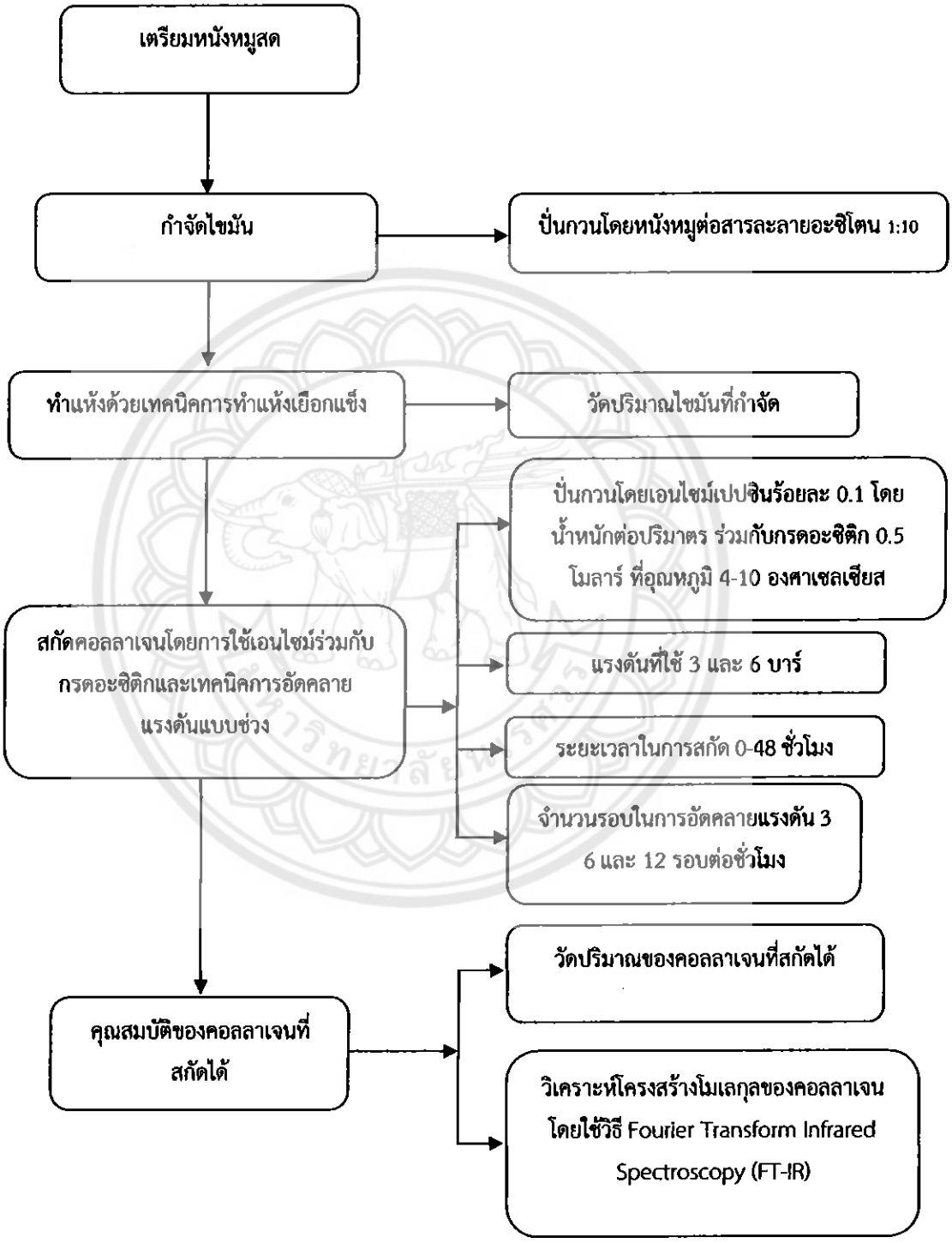
3.1.8 เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dryer) รุ่น FreeZone® 2.5 Liter Freeze Dry System จากบริษัท Labconco จำกัด

3.1.9 เครื่องปั่นกวนสารรุ่น RW 20 Digital ยี่ห้อ IKA

3.1.10 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

3.2 วิธีการทดลอง

ในการศึกษาการสกัดคอลลาเจนมีขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.1 โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการสกัดดังนี้



รูปที่ 3.1 แผนผังกระบวนการสกัดคอลลาเจน

3.2.1 การเตรียมหนังหมู

นำหนังหมูที่ได้จากหมูที่มีอายุ 3-6 เดือน จากโรงฆ่าสัตว์มาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วนำไปกำจัดไขมันที่ติดอยู่ใต้หนังออกโดยการเฉือนด้วยมีดสะอาด หลังจากนั้นจึงนำหนังหมูไปบดให้มีขนาดเล็กๆ ด้วยเครื่องบดประมาณ 5 รอบ เพื่อให้ได้หนังหมูที่มีชิ้นขนาดประมาณ 0.3x0.3x0.3 ซม^3 ดังแสดงในรูปที่ 3.2 จากนั้นจึงจะนำเอาหนังหมูทั้งหมดที่ได้หลังจากการบดแล้วไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส

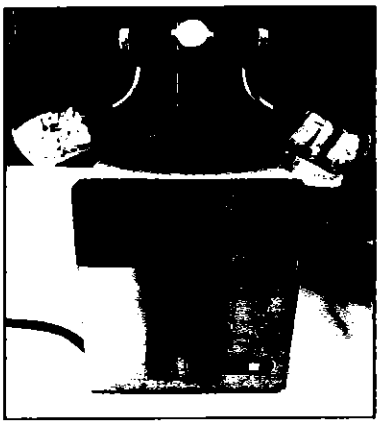
รูปที่ 3.2 หนังหมูสะอาดที่ผ่านการบด

3.2.2 การกำจัดไขมัน

การกำจัดไขมันทำได้โดยนำหนังหมูที่ผ่านการบด มากำจัดไขมันโดยใช้อะซิโตนที่อัตราส่วนระหว่างหนังหมูต่อสารละลายอะซิโตนที่ใช้ คือ 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร [12] และนำไปปั่นกวนโดยปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง Hot Plate Magnetic Stirrer เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.3 ก) หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 รอบ แล้วนำหนังหมูที่ผ่านการกำจัดไขมันไปแช่แข็ง (Freeze) เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง และนำไปทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็งเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ดังแสดงดังรูปที่ 3.3 ข) โดยที่ปริมาณน้ำหนักไขมันที่ถูกกำจัดสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3.1

$$\text{ปริมาณน้ำหนักไขมันที่ถูกกำจัด} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100 \qquad (3.1)$$

ก)



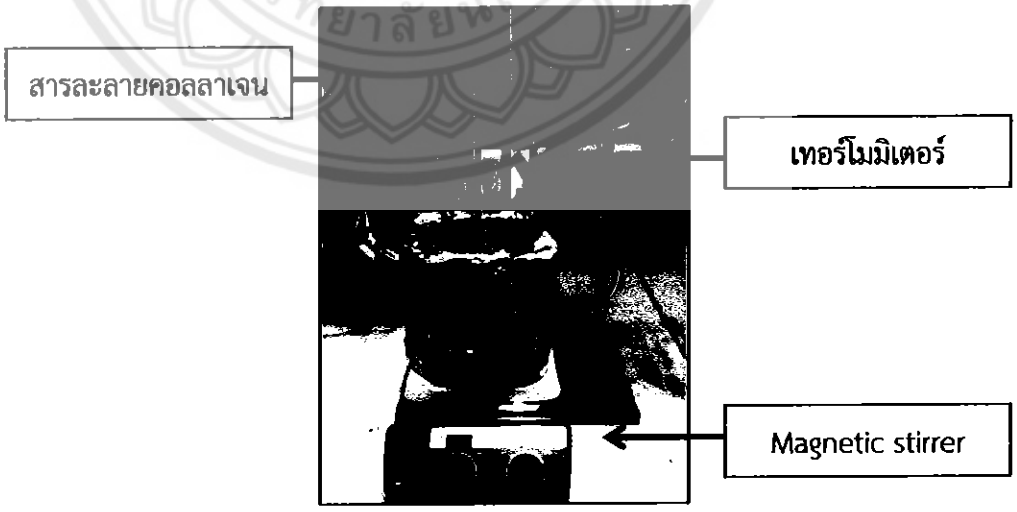
ข)

รูปที่ 3.3 ก) ขั้นตอนการกำจัดไขมันโดยการปั่นกวนด้วยสารละลายอะซิโตน ข) **การทำแห้งหนัง**หมูด้วยการทำแห้งเยือกแข็ง

3.2.3 **การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับกรดอะซิติกและเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง** (Periodic Pressurized Technique)

3.2.3.1 **การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเอนไซม์และกรดอะซิติกโดยใช้การปั่นกวน**

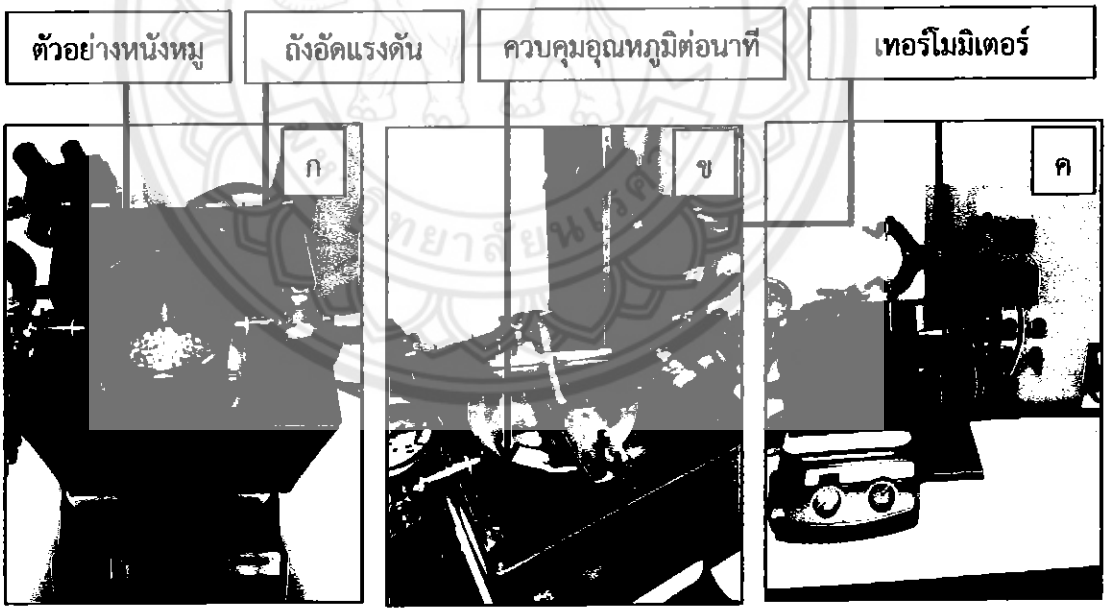
นำหนังหมูสดที่ผ่านการกำจัดไขมันและทำแห้งแล้วมาสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์**เปปซิน**ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับสารละลายกรด**อะซิติกความเข้มข้น** 0.5 **โม**ลาร์ โดยการปั่นกวนโดยใช้เครื่อง Hot Plate Magnetic Stirrer ซึ่งจะใช้**เวลาในการปั่นกวน** 0-48 **ชั่วโมง** และควบคุมอุณหภูมิในการสกัดที่ 4-10 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 รูปแสดงการสกัดคอลลาเจนโดยการปั่นกวน

3.2.3.2 การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเอนไซม์กับกรดอะซิติกร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique)

นำหนังหมูที่ผ่านการกำจัดไขมันและทำแห้งแล้วมาสกัดคอลลาเจนมาด้วยเอนไซม์เปปซินความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับกระบวนการอัดคลายแรงดันแบบช่วง นำตัวอย่างหนังหมูแห้งและสารละลายที่ใช้ในการสกัดที่เตรียมได้ใส่ลงในถังอัดแรงดันที่วางอยู่บนเครื่อง Hot Plate Magnetic Stirrer เพื่อทำการปั่นกวน ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ก) โดยในการสกัดจะควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดที่ 4-10 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำแข็งและควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ข) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการอัดคลายแรงดันจะดำเนินการที่ความดัน 3 และ 6 บาร์ และเวลาในการสกัดในช่วง 0-48 ชั่วโมง โดยการควบคุมการอัดคลายแรงดันแบบช่วง จะแสดงดังรูปที่ 3.5 ค) ในขั้นตอนการอัดคลายแรงดันจำนวนรอบที่ใช้ในการอัดคลายแรงดันจะอยู่ในช่วง 3-12 รอบต่อชั่วโมง โดยแต่ละรอบของการอัดคลายแรงดันของการอัดคลายแรงดันสามารถดูได้จากรูปประกอบที่ 2.6 อธิบายโดยสังเขป คือ การอัดคลายแรงดันที่ 6 บาร์ จำนวน 3 รอบต่อชั่วโมง จะทำการให้แรงดันแก่ระบบจนกระทั่งแรงดันสูงขึ้นถึง 6 บาร์ และรักษาแรงดันให้คงที่เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจะทำการลดแรงดันของระบบอย่างรวดเร็วจนกระทั่งแรงดันกลับเข้าสู่แรงดันบรรยากาศและทำซ้ำจนครบ 3 รอบ



รูปที่ 3.5 ก) หนังหมูกับเอนไซม์เปปซินและกรดอะซิติกในถังใส่สารตัวอย่าง ข) การควบคุมอุณหภูมิในการสกัดคอลลาเจน ค) การควบคุมการอัดคลายแรงดันแบบช่วง

3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติ

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ (%Yield)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้สามารถคำนวณได้จากใช้สัดส่วนของน้ำหนักของหนังหมูแห้งต่อน้ำหนักคอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากผ่านการทำแห้ง ดังแสดงในสมการที่ 3.2 [8] โดยลักษณะคอลลาเจนที่ได้ จะแสดงดังรูปที่ 3.6

$$\% \text{ คอลลาเจนที่สกัดได้ (Yield)} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากการทำแห้ง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักหนังหมูหลังจากการทำแห้ง (กรัม)}} \quad (3.2)$$

รูปที่ 3.6 คอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากการทำแห้ง

3.3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้

การศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนโดยการใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) เพื่อใช้ในการตรวจสอบโครงสร้างของคอลลาเจนที่สกัดได้ สามารถทำได้โดยนำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) แล้วนำมาบดผสมเข้ากับ KBr โดยจะให้มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.01 อัดขึ้นรูปให้ได้แผ่นบางประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วนำตัวอย่างที่ขึ้นรูปได้ไปวัดด้วยเครื่อง FT-IR ที่ Resolution 4 ซม$^{-1}$ และจำนวนสแกน 128 ครั้ง

บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิเคราะห์

4.1 ผลของการกำจัดไขมัน

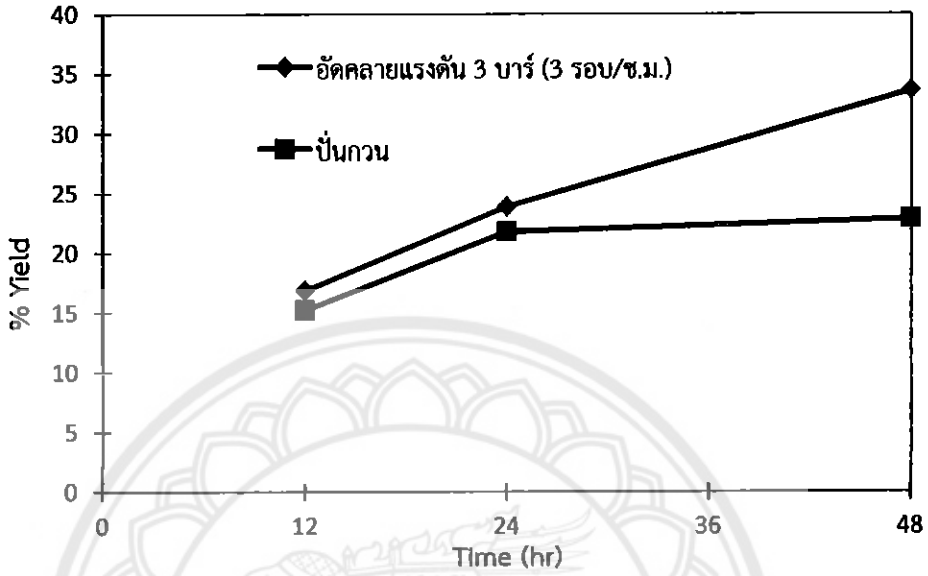
ตารางที่ 4.1 แสดงผลของการกำจัดไขมัน

ตัวอย่าง	น้ำหนักเริ่มต้น (g)	น้ำหนักสุดท้าย (g)	น้ำหนักที่หายไป (g)	ร้อยละการกำจัดไขมัน
1	10.00	5.83	4.17	41.7
2	10.00	6.13	3.87	38.7
3	10.00	6.11	3.89	38.9
ค่าเฉลี่ย			3.976	39.766
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.1369	1.3695

ผลจากการศึกษาการกำจัดไขมันโดยการปั่นกวนด้วยสารละลายอะซิโตนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าสภาวะที่ใช้ในการกำจัดไขมันสามารถกำจัดไขมันได้เฉลี่ยร้อยละ 39.8 ของน้ำหนักเริ่มต้น โดยทั่วไปในหนังหมูจะมีปริมาณไขมันอยู่ประมาณร้อยละ 70-75 ต่อน้ำหนัก [25] เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองจะพบว่าสามารถกำจัดไขมันได้ในปริมาณร้อยละ 50 ของปริมาณไขมันทั้งหมดของหนังหมู เนื่องจากสารละลายอะซิโตนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายไขมันในตัวอย่างผิวหนังหมูได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากหนังหมูมีโครงสร้างที่หนาแน่นส่งผลให้ตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างหนังหมูได้น้อย จึงส่งผลทำให้ไขมันที่อยู่ในผิวหนังหมูถูกละลายออกจากชั้นหนังหมูได้ในปริมาณน้อย

4.2 ผลของสภาวะการสกัดคอลลาเจนที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัด (%Yield)

4.2.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดและการประยุกต์ใช้กระบวนการอัดคลายแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้



รูปที่ 4.1 กราฟเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ระหว่างการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันและการปั่นกวน

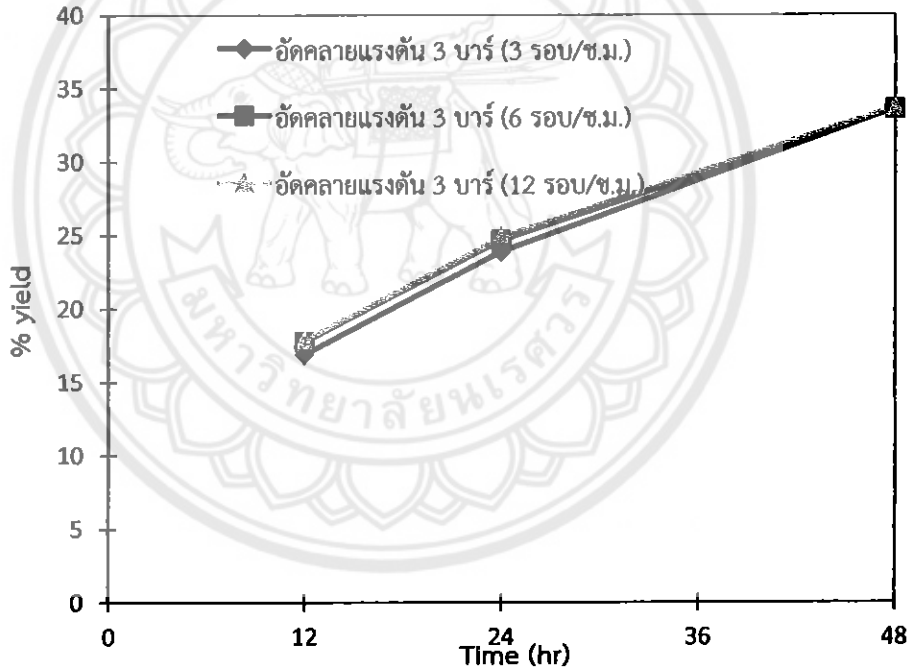
จากการศึกษาปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีการปั่นกวนที่เวลา 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 15.2 เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดคอลลาเจนเป็น 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จะส่งผลทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 21.8 และ 22.9 ตามลำดับ โดยเนื่องจาก เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดจะส่งผลให้เอนไซม์และสารละลายกรดอะซิติกสามารถแทรกซึมเข้าไปในหนังหมูได้มากขึ้นและเวลาที่สัมผัสระหว่างสารที่ใช้สกัดกับคอลลาเจนนานขึ้นจึงส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูงขึ้นด้วย

เมื่อประยุกต์ใช้กระบวนการอัดคลายแรงดันที่ความดัน 3 บาร์ (3 รอบต่อชั่วโมง) พบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ร้อยละ 16.9 จากนั้นเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดคอลลาเจนเป็น 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จะส่งผลทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 23.9 และ 33.6 ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การประยุกต์ใช้กระบวนการอัดคลายแรงดันส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นทุกช่วงเวลาของการสกัดคอลลาเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดคอลลาเจนแบบการปั่นกวน เนื่องจากการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันสามารถช่วยทำให้การแทรกซึมของเอนไซม์เข้าไปในผิวหนังหมูที่มีความซับซ้อนได้มากขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ I. Prasertsung และคณะ [5] ซึ่งทำการศึกษาการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์

จากหนังหมูด้วยกระบวนการการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับเอนไซม์ พบว่าการประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์ออกจากโครงสร้างของหนังหมูได้สูงขึ้น เนื่องจากแรงดันสามารถช่วยทำให้เอนไซม์สามารถแทรกซึมเข้าไปในหนังหมูได้ดีขึ้น ส่งผลทำให้เซลล์ถูกกำจัดได้มากขึ้น นอกจากนี้แล้วจากงานวิจัยของ D. Li และคณะ [4] ได้ศึกษาผลของอัลตราโซนิคที่มีผลต่อการสกัดคอลลาเจนจากเส้นเอ็นวัว พบว่าการใช้อัลตราโซนิคจะเพิ่มปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้และจะช่วยลดระยะเวลาในการสกัดเมื่อเทียบกับการใช้วิธีการสกัดด้วย เปปซินเพียงอย่างเดียว เนื่องจากอัลตราโซนิคจะทำหน้าที่แยกเอนไซม์เปปซินและทำหน้าที่เปิดเส้นใยของคอลลาเจน จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดคอลลาเจนได้ดีขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองและงานวิจัยดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้แรงทางกลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดคอลลาเจนได้

4.2.2 ผลของจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ (%Yield)



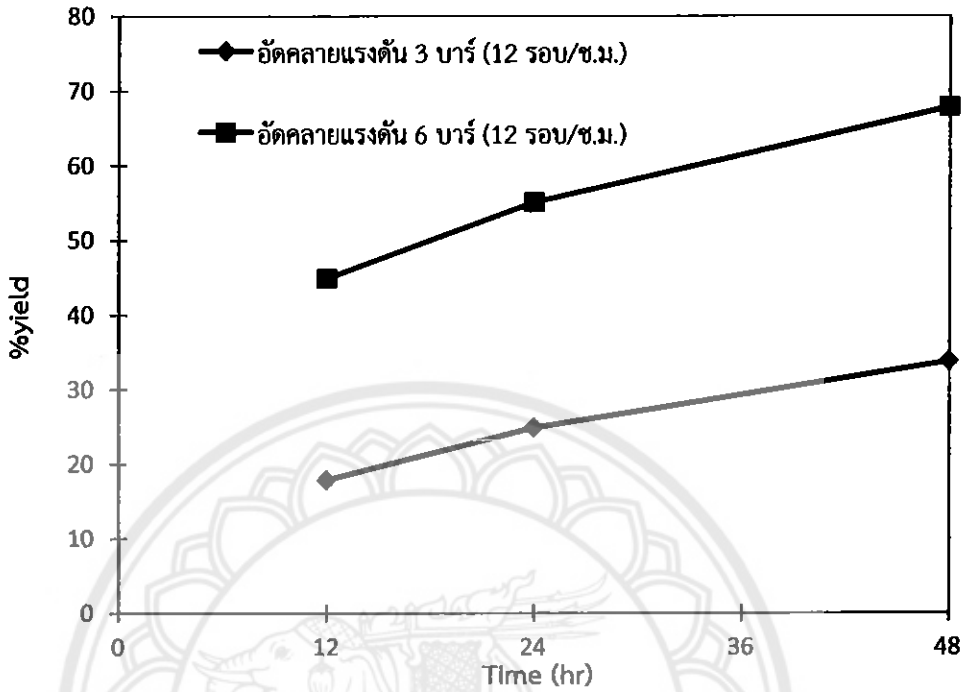
รูปที่ 4.2 กราฟเปรียบเทียบผลของจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้

ในการศึกษาผลของจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ โดยศึกษาที่ความดัน 3 บาร์ และปรับจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดัน 3 ค่า คือ 3 6 และ 12 รอบต่อชั่วโมง จากผลการศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 4.2 จะพบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันที่จำนวน 3 รอบต่อชั่วโมง และเมื่อใช้เวลาในการสกัดคอลลาเจน 12 24 และ 48 ชั่วโมง จะทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 16.9 23.9 และ 33.6 ตามลำดับ เมื่อเพิ่ม

จำนวนรอบการอัดคลายแรงดันเป็น 6 รอบต่อชั่วโมง พบว่าการสกัดคอลลาเจนที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง จะได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 17.8 24.7 และ 33.6 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มจำนวนรอบการอัดคลายแรงดันเป็น 12 รอบต่อชั่วโมง พบว่าปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง จะได้ร้อยละ 17.9 24.9 และ 33.7 ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจากการเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันจะส่งผลทำให้เอนไซม์และกรดอะซิติกสามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในผิวหนังหมูได้มากขึ้นและเมื่อลดแรงดันจะทำให้สารละลายที่ใช้สกัดสามารถดึงคอลลาเจนออกมาจากหนังหมูและเมื่อมีการเพิ่มความดันอีกครั้งก็จะสามารถทำให้สารละลายที่ยังอยู่รอบๆ ของหนังหมูสามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในหนังหมูได้อีกครั้ง จึงเปรียบเสมือนเป็นการวนสารที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ I. Prasertsung และคณะ [5] ซึ่งทำการศึกษาการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมูด้วยกระบวนการการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับเอนไซม์ พบว่าการเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันแบบช่วงสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ออกจากโครงสร้างของหนังหมูได้มากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์จะแทรกซึมผ่านเข้าไปในชั้นหนังหมูและเมื่อลดแรงดันจะทำให้สารละลายที่ใช้สามารถดึงเซลล์ที่ต้องการกำจัดออกมาจากชั้นหนังหมูได้และเมื่อมีการเพิ่มแรงดันอีกครั้งก็จะทำให้สารละลายที่อยู่โดยรอบสามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในชั้นหนังหมูได้อีกครั้ง ซึ่งจะเป็นการวนสารตามจำนวนรอบที่ใช้ เมื่อเพิ่มจำนวนรอบก็จะส่งผลให้เซลล์ถูกกำจัดมากขึ้น นอกจากนี้แล้วกระบวนการการอัดคลายแรงดันจะเป็นกระบวนการที่ช่วยลดสารยับยั้งเอนไซม์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการการสกัดซึ่งส่งผลทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงไปในกระบวนการสกัด

4.2.3 ผลของแรงดันของการอัดคลายแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ (%Yield)



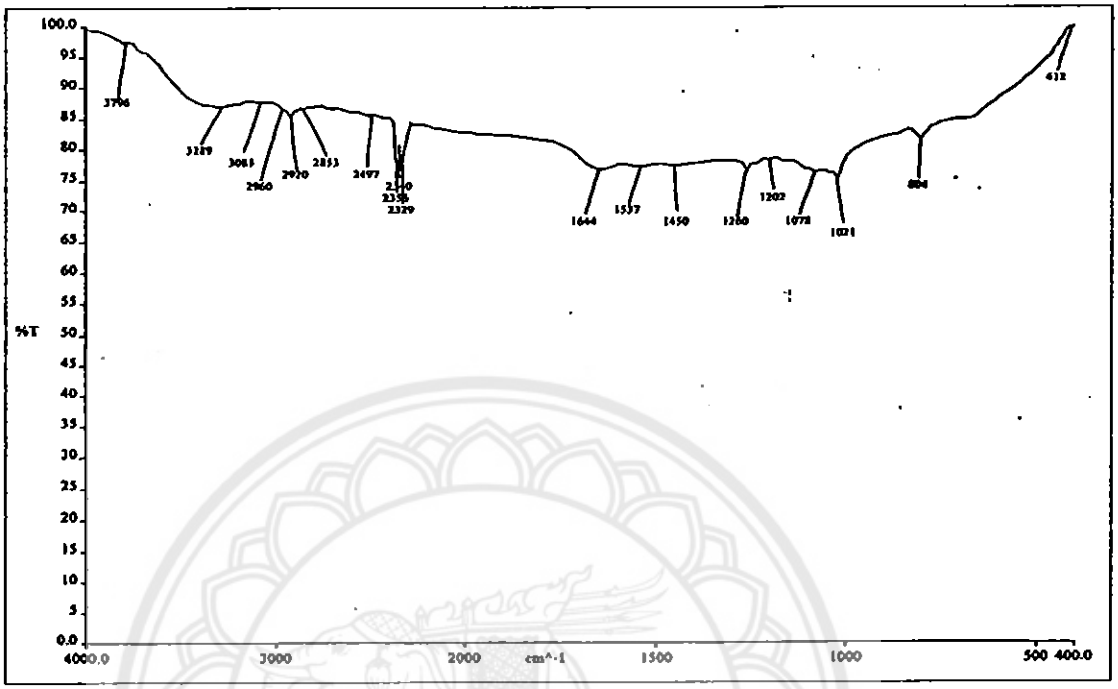
รูปที่ 4.3 กราฟเปรียบเทียบผลของแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

จากการศึกษาผลของแรงดันในการอัดคลายแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยด้วยการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันที่ 3 บาร์ จำนวน 12 รอบต่อชั่วโมง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 17.8 เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดคอลลาเจนเป็น 24 และ 48 ชั่วโมง จะส่งผลทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 24.9 และ 33.7 ตามลำดับ โดยเมื่อเพิ่มแรงดันในกระบวนการสกัดคอลลาเจนเป็น 6 บาร์ พบว่าการสกัดคอลลาเจนที่จำนวน 12 รอบต่อชั่วโมง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 44.9 เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดคอลลาเจนเป็น 24 และ 48 ชั่วโมง จะส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 55.1 และ 67.7 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มแรงดันในการสกัดคอลลาเจนจาก 3 บาร์ เป็น 6 บาร์ จะส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ โดยทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มแรงดันจะทำให้สารละลายกรดอะซิติกและเอนไซม์เปปซินสามารถแทรกซึมเข้าไปในหนังหมูได้มากขึ้นจึงส่งผลให้สกัดคอลลาเจนได้มากขึ้น

4.3 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน

4.3.1 ลักษณะของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน



รูปที่ 4.4 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน [23]

จากรูปที่ 4.4 แสดงถึง FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน โดยทั่วไปแล้วคอลลาเจน Type I ที่สกัดได้จากหนังหมูจะแสดงลักษณะของการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3298 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch คู่กับ Hydrogen Bond ที่ตำแหน่ง 2920 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch ที่ตำแหน่ง 1644 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง 1450 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Bend และที่ตำแหน่ง 1078 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C – O Stretch ดังแสดงในตารางที่ 4.2

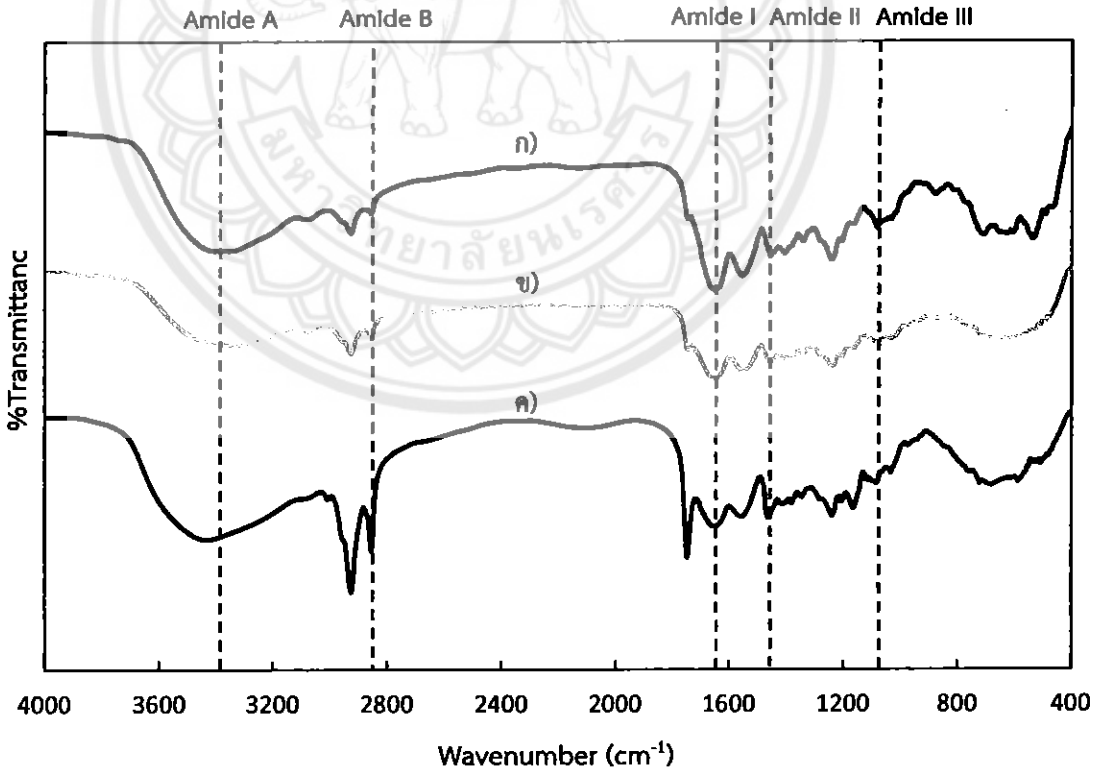
ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน [23]

Region	Standard	Assignment
Amide A	3289	NH Stretch Coupled with Hydrogen Bond.
Amide B	2920	CH_2 Asymmetrical Stretch.
	2853	CH_2 Asymmetrical Stretch.

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน [23]

Region	Standard	Assignment
Amide I	1644	C=O Stretch/Hydrogen Bond Coupled with CN Strech.
Amide II	1537	NH Bend Coupled with CN Stretch.
	1450	CH_2 Bend.
	-	COO – Symmetrical Stretch.
	-	CH_2 Wagging of Proline.
Amide III	1260	NH Bend Coupled with CN Stretch.
	1078	C – O Stretch.
	1021	C – O Stretch.
	804	Skeletal Stretch.

4.3.2 ลักษณะของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้



รูปที่ 4.5 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธี ก) การปั่นกวน เวลา 48 ชั่วโมง ข) การอัดคลายแรงดันที่ 3 บาร์ จำนวน 12 รอบต่อชั่วโมง เวลา 48 ชั่วโมง ค) การอัดคลายแรงดันที่ 6 บาร์ จำนวน 12 รอบต่อชั่วโมง เวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.5 แสดงถึง FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีการปั่นกวนและเทคนิคการอัดคลายแรงดัน จากการวิเคราะห์พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีการปั่นกวนแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3354 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch คู่กับ Hydrogen Bond ที่ตำแหน่ง 2855 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch ที่ตำแหน่ง 1644 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง 1455 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Bend และที่ตำแหน่ง 1081 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C – O Stretch

คอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันที่ 3 บาร์ จำนวน 12 รอบต่อชั่วโมง เวลา 48 ชั่วโมง แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3332 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันในส่วนของ NH Stretch ที่ตำแหน่ง 2854 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch ที่ตำแหน่ง 1648 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง 1455 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Bend และที่ตำแหน่ง 1082 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C – O Stretch

คอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันที่ 6 บาร์ จำนวน 12 รอบต่อชั่วโมง เวลา 48 ชั่วโมง แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3425 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch ที่ตำแหน่ง 2854 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch ที่ตำแหน่ง 1650 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง 1461 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Bend และที่ตำแหน่ง 1084 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C – O Stretch

จากผลการทดลองพบว่าลักษณะการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้มีทั้งหมด 3 วิธี แสดงตำแหน่งที่สอดคล้องกับคอลลาเจนมาตรฐาน ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การประยุกต์การอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้ กล่าวได้ว่าการประยุกต์ใช้แรงกลไม่ทำลายหรือไม่ชักนำให้โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนเสียสภาพ [5] และจากรูปที่ 4.5 ยังแสดงพีคของสารละลายกรดอะซิติกที่ยังหลงเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย ซึ่งกรดอะซิติกมีสูตรโครงสร้าง คือ CH_3COOH และมีหมู่ฟังก์ชัน ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของกรดอะซิติกมาตรฐาน [23]

ซม$^{-1}$	หมู่ฟังก์ชัน	รายละเอียด
3400-2400	O–H stetching	กรดคาร์บอกซิลิก
1670-1750	C=O stretching	กรดคาร์บอกซิลิก
1450-1375	C-H stretching	หมู่ CH_3
1000-1300	C-O stretching	กรดคาร์บอกซิลิก

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

จากศึกษาการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกโดยวิธีการปั่นกวนและเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง พบว่าการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นทุกช่วงเวลาของการสกัดคอลลาเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดคอลลาเจนโดยการปั่นกวน ในการเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้โดยให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้น การเพิ่มแรงดันในการอัดคลายแรงดันจะส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้โดยให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นและในการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติความสามารถทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้ กล่าวได้ว่าการประยุกต์ใช้แรงกลจะไม่ทำลายหรือไม่ส่งผลให้โครงสร้างของคอลลาเจนเสียภาพ นอกจากนี้ผลของการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติก และเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง พบว่าสภาวะการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกโดยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ความดัน 6 บาร์ โดยใช้จำนวนรอบที่ 12 รอบต่อชั่วโมง และใช้เวลาในการสกัด 48 ชั่วโมงจะส่งผลให้ปริมาณคอลลาเจนที่สามารถสกัดได้มากที่สุด คือ ร้อยละ 67.7

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการทดลองการสกัดคอลลาเจนด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง อย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อให้ได้ชุดข้อมูลทางสถิติที่แม่นยำและเชื่อถือได้

5.2.2 ในขั้นตอนการวิเคราะห์คุณสมบัติของคอลลาเจนที่สกัดได้ควรเพิ่มเติมการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของคอลลาเจน Type I และเพิ่มเทคนิค Differential Scanning Calorimeters (DSC) เพื่อศึกษาอุณหภูมิการเสียสภาพของคอลลาเจนที่สกัดได้

เอกสารอ้างอิง

[1] A.J. Bailey and N.D. Light. (1989). **Connective Tissue in Meat and Meat Product** (p.235-346), England, Elsevier Applied Science.

[2] U.Hempel, V. Hintze, S. Möller ,M. Schnabelrauch ,D. Scharnweber, P. Dieter. (2012). Artificial extracellular matrices composed of collagen I and sulfated hyaluronan with adsorbed transforming growth factor b1 promote collagen synthesis of human mesenchymal stromal cells. **ActaBiomaterialia,** Vol. 8, pp. 659–666.

[3] **ตระกูล พรหมจักร. (2552). การสกัดเจลาตินจากหนังปลาเผาะ วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.**

[4] D. Li, Ch. Mu, S. Cai, & W. Lia. (2009). Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. **Ultrasonic Sonochemistry,** Vol. 5, pp. 605-609.

[5] I. Prasertsung, S. Kanokpanont,T. Bunaprasert,V. Thanakit & S.Damrongsakkul. (2007). Development Of Acellular Dermis From Porcine Skin Using Periodic pressurized technique. **Biomaterials,** Vol. 10, pp. 210-219.

[6] **ชลธิชา สุรรัตน์ และ ธนัชชัย ชื่อทองมอญ. (2555). การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง. ปริญญานิพนธ์วิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.**

[7] **ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์. (2551). คอลลาเจนจากเกล็ดปลา:การสกัดและคุณสมบัติบางประการ. วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.**

[8] **ตระกูล พรหมจักร. (2552). การสกัดเจลาตนจากหนังปลาเผาะ. วิทยานิพนธ์ วท.บ., มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.**

[9] **สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพณิชยกิจ. (2551). ชีวโมเลกุล (หน้า 52-136). กรุงเทพฯ: บริษัท วี.พริ้นท์ (1991) จำกัด.**

[10] **ผศ.ดร. ศิริรัตน์ จันท์จารุณี. (2551). เอกสารประกอบการสอนวิชาเทคนิคทางเคมีอินทรีย์, ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.**

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[11] D. Buddhasukh, A. Teerawutgulrag, P. Meepowpan, T. Junpirom, (2551). **Organic Chemistry Laboratory III Department of Chemistry,** Faculty of Science. Chiang Mai University, Chiang Mai.

[12] **นันทพร อัคนิจ,วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร,วรรณีจิรภาคย์กุล และ นงนุช รักสกุลไทย.(2550). ผลของอุณหภูมิและสัดส่วนของกรดต่อการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกุด. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.**

[13] ปราณี อ่านเปรื่อง. (2547). **เอนไซม์ทางอาหาร** (หน้า 55-234). กรุงเทพฯ: **สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.**

[14] **ชัยณรงค์ คันธพนิต. (2529). วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์** (หน้า 35-67). กรุงเทพฯ: **สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.**

[15] **ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล. (2547). เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง** (หน้า 3-18). **กรุงเทพฯ: บริษัท ทรินิตี้ พลับลิชชิ่ง จำกัด.**

[16] P. Semal & R. Orban. (1994). Collagen Extraction from Recent and Fossil Bones: Quantitative and Qualitative Aspects. **Journal of Archaeological Science,** Vol. 22, pp. 463–467.

[17] E. Skierka. (2003). The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod. **Food Chemistry,** Vol. 105, pp. 1302–1306.

[18] J.H. Muyonga, C.G.B. Cole, K.G. Duodu. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young andadult Nile perch (Latesniloticus). **Food Chemistry,** Vol. 85, pp. 81–89.

[19] M. Sadowska, I. Kołodziejska, N. Celina. (2009). Isolation of collagen from the skins of Balticcod. **Food Chemistry,** Vol. 81, pp. 257-262.

[20] **ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์,วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร และ วรรณีจิรภาคย์กุล. (2549). การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง (Lutjanusargentimaculatus). วารสารระดับชาติและนานาชาติ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.**

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[21] F.Y. Cheng, F.W. Hsu, H.S. Chang, L. Lin& R. Sakata. (2009). Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. **Food Chemistry,** Vol. 113, pp. 563-567.

[22] P. Singh, S.Benjakul, S. Maqsood, H.Kishimura. (2011). Isolation and haracterisation of collagen extracted from the skin of stripedcatfish (Pangasianodonhypophthalmus). **Food Chemistry,** Vol. 124, pp. 97–105.

[23] S. Vairamani, R. Pasiyappazham, S. Namasivayam, S. Sadhasivan, S. Palaniappan, M.Meivelu,et al.(2012). Extraction, structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of Sepiellainermis (Orbigny, 1848), **African Journal of Biotechnology,** Vol. 11, pp. 14326-14337.

[24] แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. (2547). **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ** (หน้า 108-192). กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.

[25] G. M. Gray and H. J. Yardley. (2013). Lipid compositions of cells isolated from pig, human, and rat epidermis, **Journal of lipid research,** Vol. 16, pp. 434-440.

ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ก.1 แสดงปริมาณการกำจัดไขมัน

ตัวอย่าง	น้ำหนักเริ่มต้น (g)	น้ำหนักสุดท้าย (g)	น้ำหนักที่หายไป (g)	ร้อยละการกำจัดไขมัน
1	10.00	5.83	4.17	41.7
2	10.00	6.13	3.87	38.7
3	10.00	6.11	3.89	38.9
		ค่าเฉลี่ย	3.976	39.766
		SD	0.1369	1.3695

ตารางที่ ก.2 แสดงการคำนวณปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

	เวลา (hr)	น้ำหนักเริ่มต้น (g)	น้ำหนักสุดท้าย (g)	ร้อยละของคอลลาเจนที่สกัดได้
ปั่นกวน	12	10.00	1.5236	15.236
	24	10.00	2.1804	21.804
	48	10.00	2.2851	22.851
อัดคลายแรงดัน 3 รอบ (3 บาร์)	12	10.00	1.6875	16.875
	24	10.00	2.3885	23.885
	48	10.00	3.3595	33.595
อัดคลายแรงดัน 6 รอบ (3 บาร์)	12	10.00	1.775	17.75
	24	10.00	2.468	24.68
	48	10.00	3.361	33.61
อัดคลายแรงดัน 12 รอบ (3 บาร์)	12	10.00	1.7835	17.835
	24	10.00	2.488	24.88
	48	10.00	3.3725	33.725
อัดคลายแรงดัน 12 รอบ (6 บาร์)	12	10.00	4.4874	44.874
	24	10.00	5.5057	55.057
	48	10.00	6.7736	67.736