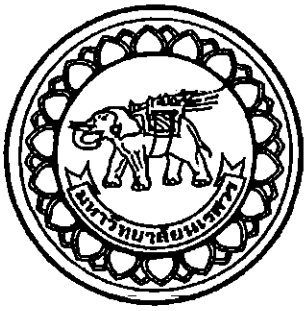


การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการใช้กรด

COLLAGEN EXTRECTION FROM PORCINE SKIN USING ACID

นายกัณฐัศว์ ชินวัชร์ชยังกูร รหัสนิสิต 52365053

นางสาวปาริฉัตร สุยะวา รหัสนิสิต 52365084

นางสาววารวิชนี โปฎก รหัสนิสิต 52365176

ห้องสมุดคณะวิศวกรรมศาสตร์
วันที่รับ 5 ส.ค. 2556
เลขทะเบียน 1632387X
เลขเรียกหนังสือ ปร.
มหาวิทยาลัยนเรศวร ท 384 ก 2556

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2555

ใบรับรองปริญญานิพนธ์

ชื่อหัวข้อโครงงาน การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการใช้กรด

ผู้ดำเนินโครงงาน นายกัณฐัศว์ ชินวัชร์ชยังกูร รหัส 52365053

นางสาวปาริฉัตร สุยะวา รหัส 52365084

นางสาววารวิชนี โปฏก รหัส 52365176

ที่ปรึกษาโครงงาน ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ภาควิชา วิศวกรรมอุตสาหการ

ปีการศึกษา 2555

.....

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

.....ที่ปรึกษาโครงงาน

(ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์)

.....กรรมการ

(ดร.นพวรรณ โม้ทอง)

.....กรรมการ

(ดร.ภมรรัตน์ จันธรรม)

.....กรรมการ

(อาจารย์อาภาภรณ์ จันทร์ปิรักษ์)

ชื่อหัวข้อโครงงาน	การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการใช้กรด		
ผู้ดำเนินโครงงาน	นายกัณฐัศว์	ชินวัชร์ชยังกูร	รหัส 52365053
	นางสาวปาริฉัตร	สุยะวา	รหัส 52365084
	นางสาววารวิชนี	โปฎก	รหัส 52365176
ที่ปรึกษาโครงงาน	ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์		
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี		
ภาควิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ		
ปีการศึกษา	2555		

บทคัดย่อ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ได้ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยใช้กรดเพื่อเปรียบเทียบผลของชนิดและความเข้มข้นของกรดที่มีต่อการสกัดคอลลาเจนโดยทำการทดลองสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยใช้กรด 3 ชนิด คือ กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ที่ความเข้มข้น 0.1-0.6 โมลาร์ และวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) และวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC)

จากผลการทดลองได้ทำการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยกรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ที่อุณหภูมิ 5-15 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการสกัด 0-72 ชั่วโมง อัตราส่วนหนังหมูแห้งต่อสารละลายกรด 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.6 โมลาร์ ตามลำดับ พบว่าปริมาณของคอลลาเจนเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการสกัด การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ส่งผลทำให้ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ลดลง การสกัดด้วยกรดอะซิติกให้ปริมาณคอลลาเจนสูงสุด และกรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก ตามลำดับ จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีเมื่อเปรียบเทียบกับคอลลาเจนมาตรฐานและจากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) พบว่าอุณหภูมิการเสียสภาพ (T_d) ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก แสดงตำแหน่งพีคที่ 148.7, 172.51 และ 149.9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือของหลายๆ ฝ่าย โดยเฉพาะ ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา แนะนำวิธีแก้ปัญหา รวมถึงข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความดูแลเอาใจใส่ ติดตามการดำเนินโครงงานมาโดยตลอดและขอขอบคุณคณะอาจารย์ประจำสาขาวิชาวิศวกรรมเคมีและภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ มหาวิทยาลัยนเรศวร ทุกท่านที่ได้ให้วิชาความรู้เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

นอกจากนี้ ยังต้องขอขอบคุณแม่บ้านและสถานที่ห้องปฏิบัติการเคมีที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการทำการทดลองเพื่อเก็บข้อมูลที่จะนำไปใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้ดำเนินโครงงานใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้การดูแลอบรมสั่งสอน และให้กำลังใจด้วยดีเสมอมาตลอดการดำเนินโครงงานจนสำเร็จการศึกษา

คณะผู้ดำเนินโครงงานวิศวกรรม
นายกัณฐัศว์ ชินวัชร์ชยังกูร
นางสาวปาริฉัตร สุยะวา
นางสาววารวิชนี โปฎก

มีนาคม 2555

สารบัญ

หน้า

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

บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงาน 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน 2
1.3 ขอบเขตการดำเนินโครงงาน 2
1.4 สถานที่ในการดำเนินโครงงาน 3
1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน 3
1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน 3

บทที่ 2 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวกับคอลลาเจน 4
2.1 คอลลาเจน 4
2.2 โครงสร้างของคอลลาเจน 4
2.3 ชนิดของคอลลาเจน 5
2.4 ประโยชน์ของคอลลาเจน 7
2.5 การสกัดพื้นฐาน 8
2.6 การสกัดคอลลาเจน 11
2.7 องค์ประกอบและโครงสร้างของหนังหมู 15
2.8 การทำแห้งเยือกแข็ง 20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 แนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24

บทที่ 4 วิธีการทดลอง 28

4.1 วัตถุดิบและสารเคมี 28

4.2 วิธีการทดลอง 30

4.3 กระบวนการการสกัดคอลลาเจน 31

4.4 การวิเคราะห์ผล 32

บทที่ 5 ผลและการวิเคราะห์ผล 34

5.1 ผลของสภาวะการสกัดที่มีต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ 34

5.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจน 37

5.3 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านความร้อน 40

บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 43

6.1 สรุปผลการทดลอง 43

6.2 ข้อเสนอแนะ 43

เอกสารอ้างอิง 45

ภาคผนวก ก 48

ภาคผนวก ข 54

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงการ....3

2.1 ชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ....6

2.2 ค่าคงตัววิกฤตและจุดร่วมสาม....22

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงโครงสร้างอันดับ 1, 2 และ 3 ของคอลลาเจน....4

2.2 (ก) Light-solvent extractor และ (ข) Heavy-solvent extractor....9

2.3 Soxhlet extraction apparatus....10

2.4 แสดงการเปรียบเทียบผิวหนังของมนุษย์กับผิวหนังของหมู....20

2.5 หลักพื้นฐานของกระบวนการทำแห้ง....21

4.1 กระบวนการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมู....29

4.2 หนังหมูแห้ง....30

4.3 แสดงวิธีการสกัดคอลลาเจนด้วยกรด....31

4.4 สารละลายคอลลาเจน....32

4.5 คอลลาเจนแห้ง (Dried Collagen)....32

5.1 แสดงผลของชนิดของกรดและเวลาที่ใช้ในการสกัด....35

5.2 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่มีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ที่เวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง....36

5.3 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่มีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ที่เวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง....36

5.4 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไนตริกที่มีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ที่เวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง....37

5.5 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR spectrum ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.1 โมลาร์....39

5.6 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR spectrum ที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์....39

5.7 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR spectrum ที่ความเข้มข้นของกรดไนตริก 0.1 โมลาร์....40

5.8 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC)....41

5.9 แสดงลำดับความแรงของกรดและเบสตัวอย่างตามทฤษฎีของเบรินสเตต-ลาวรี....42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงาน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีปริมาณมากที่สุดของโปรตีนภายในร่างกาย คอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลักของ ผิวหนัง เอ็น กระดูก และหลอดเลือด ซึ่งปริมาณของคอลลาเจนที่แตกต่างกันจะขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อและอายุของสัตว์ โครงสร้างของคอลลาเจนจะมีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโนชนิดต่างๆ มีผลทำให้คุณสมบัติโดยทั่วไปของคอลลาเจนมีความแตกต่างกัน โดยชนิดคอลลาเจนที่พบส่วนใหญ่จะเป็นคอลลาเจนชนิด Type I และ Type II ซึ่งคอลลาเจนทั้ง 2 ชนิดนี้จะพบมากในผิวหนังและกระดูก คอลลาเจนสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ อาทิเช่น เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม ใช้ในด้านความงามและเครื่องสำอางค์ อีกทั้งยังใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อาทิ เนื้อเยื่อกระดูกและผิวหนัง [1]

คอลลาเจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากคอลลาเจนมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ กล่าวคือ เมื่อนำมาประยุกต์ใช้งานจะไม่ก่อให้เกิดการต่อต้านทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย คอลลาเจนนิยมนำมาขึ้นรูปเป็นส่วนประกอบสำหรับสร้างชั้นหนังแท้โดยนำมาประยุกต์ใช้เป็นแผ่นปิดแผลชีวภาพหรือทำเป็นกระดูกเทียม ซึ่งข้อดี คือ เมื่อใช้แล้วคอลลาเจนสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Biocompatible)

ในปัจจุบันการสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้ทั้งวิธีการใช้เอนไซม์และสารเคมี เช่น กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก อย่างไรก็ตามการสกัดคอลลาเจนด้วยสารเคมีจะมีความซับซ้อนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ดังจะเห็นได้จากรายงานของ M. Sadowska และคณะ [2] ได้ทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละลายกรดอะซิติกและกรดซิตริก ในการแยกคอลลาเจนออกจากผิวหนังของปลาค็อดพบว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละลายกรดอะซิติกที่อัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 85 และเมื่อมีการเพิ่มอัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกมีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดซิตริกมีปริมาณคงที่ไม่เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนที่ใช้ในการสกัด จากรายงานของ S.K. Zeng และคณะ [3] ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของคอลลาเจนจากผิวหนังของปลานิลโดยใช้สารละลายกรดอะซิติกพบว่าปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 39.4 ของน้ำหนักแห้ง จากการวิเคราะห์มีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีนประมาณร้อยละ 35.6 ส่วนโพลีนและไฮดรอกซีโพลีนพบในปริมาณมาก อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจน คือ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าต่ำกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังซึ่งค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับปลากระพงแดง คอลลาเจนที่พบเป็นคอลลาเจนประเภท Type I ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างโมเลกุลครบ 3 สาย คือ $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ และค่าที่ทำให้คอลลาเจนตกตะกอนอยู่ในช่วง pH>2 จากรายงานของ I. Bae และคณะ [4] ได้ทำการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของคอลลาเจนที่สกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติกจากผิวหนังของปลาชนิดต่างๆ พบว่าปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลาสลิดดำ ปลาสลิดทะเล ปลากระเบนนก ปลากระเบนแดง และปลากระเบนยันไต มีปริมาณ

คอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 3.9, 3.4, 5.3, 5.7 และ 5.5 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ คอลลาเจนที่สกัดได้จัดเป็นคอลลาเจนชนิด Type I ซึ่งประกอบด้วยสาย α_1 2 สาย และสาย α_2 1 สาย โดยคอลลาเจนของสายพันธุ์ปลากระเบนจะมีการเสียสภาพที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าของปลาสลิดดำและปลาสลิดทะเล ค่าที่ทำให้คอลลาเจนเกิดการตกตะกอนอยู่ในช่วง pH 2-4 จากรายงานของ S. Zung และคณะ [5] ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและลักษณะของคอลลาเจนจากผิวหนังของปลาช่อนทะเลโดยใช้สารละลายกรดอะซิติกและเอนไซม์เพปซินในการสกัดคอลลาเจน พบว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละสายกรดอะซิติกมีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 35.5 และการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์เพปซินมีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 12.3 คอลลาเจนที่พบเป็นคอลลาเจนประเภท Type I ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างโมเลกุลครบ 3 สาย คือ α_1, α_2 และ α_3 จากการวิเคราะห์ทางความร้อนพบว่าคอลลาเจนเสียสภาพในสารละลายกรดอะซิติกและเอนไซม์เพปซินที่อุณหภูมิ 34.62 และ 33.97 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากรายงานนี้ชี้ให้เห็นว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มากกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์ โดยทั่วไปแล้ววัตถุดิบที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดคอลลาเจนส่วนใหญ่มาจากสัตว์ อาทิเช่น ผิวหนังวัว เกล็ดปลา กระดูก และเอ็น ผิวหนังหมูเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่ามีองค์ประกอบของคอลลาเจนอยู่ในปริมาณสูงโดยลักษณะทางกายภาพของคอลลาเจนในหนังหมูมีความคล้ายคลึงกับมนุษย์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น อาทิเช่น วัว กระบือ ปลา เป็นต้น [1] อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการนำผิวหนังของหมูมาใช้ในกระบวนในการสกัดคอลลาเจน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษากระบวนการสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารเคมีและหนังหมูเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากหนังหมูสามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย มีราคาถูก และมุ่งเน้นนำคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังหมูไปประยุกต์ใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

เพื่อศึกษาผลของชนิดของกรดและความเข้มข้นของกรดที่มีผลต่อการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมู

1.3 ขอบเขตในการดำเนินโครงงาน

1.3.1 ตัวแปรที่ควบคุม

1.3.1.1 ช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง คือ 5-15 องศาเซลเซียส

1.3.1.2 ใช้หนังหมูในช่วงอายุ 3-6 เดือน

1.3.1.3 อัตราส่วนของหนังหมู/กรด 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

1.3.2 ตัวแปรต้น

1.3.2.1 ศึกษาผลของชนิดกรด

ก. กรดอะซิติก

ข. กรดไฮโครคลอริก

ค. กรดไนตริก

1.3.2.2 ความเข้มข้นของกรดแต่ละชนิดในช่วง 0.1-0.6 โมลาร์

1.3.2.3 เวลาที่ใช้ในการสกัดในช่วง 0-72 ชั่วโมง

1.4 สถานที่ในการดำเนินโครงงาน

ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน

ตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2555 ถึง 31 มกราคม พ.ศ. 2556

1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน

ตารางที่ 1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน

	การดำเนินโครงงาน	ช่วงเวลา											
		มิ.ย.		ก.ค.		ส.ค.		ก.ย.		ต.ค.		พ.ย.		ธ.ค.		ม.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																↔

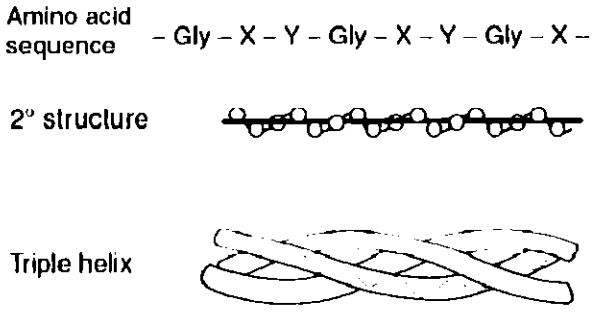
บทที่ 2
ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวกับคอลลาเจน

2.1 คอลลาเจน [6]

คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันส่วนมากจะพบในร่างกายของสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งจะมีโปรตีนประมาณร้อยละ 30 ของโปรตีนทั้งหมดภายในร่างกายโดยส่วนใหญ่จะพบมากในผิวหนังเอ็นกระดูกและกระดูกอ่อน โดยที่ปริมาณของคอลลาเจนจะมีความแตกต่างกันไปนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อและอายุของสัตว์ ลักษณะของคอลลาเจนโดยทั่วไปจะมีความคล้ายคลึงกันแต่จะมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของในกรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโนจะทำให้คุณสมบัติโดยทั่วไปของคอลลาเจนมีความแตกต่างกันไป ซึ่งปัจจัยที่สำคัญที่พบว่ามีอิทธิพล คือ สายพันธุ์และชนิดของเนื้อเยื่อ

2.2 โครงสร้างของคอลลาเจน [7]

คอลลาเจนประกอบด้วยโปรตีนรูปทรงกระบอกซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 -15 อังสตรอม ยาวประมาณ 2800 อังสตรอม ประกอบด้วยสายเปปไทด์ซึ่งเรียกว่า α-chain 3 สายจะมีการขดรวมกันเป็นฮีลิกซ์สามสาย (Triple Helix) โดยจะประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน สาย α-chain แต่ละสายมีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน โดยมวลโมเลกุลทั้งหมดของคอลลาเจนประมาณ 300,000 ดาลตัน โพลีเปปไทด์ของคอลลาเจนจะขดเป็นเกลียวเกือบทั้งสายยกเว้นส่วนปลาย อย่างไรก็ตามเนื่องจากคอลลาเจนมีกรดอะมิโนโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนสูงทำให้โครงสร้างเกลียวฮีลิกซ์ของคอลลาเจนแตกต่างจากแอลฟาฮีลิกซ์ (α-helix) ทั่วไป โดยฮีลิกซ์ของคอลลาเจนมีลักษณะวนซ้ายและมีกรดอะมิโน 3 ตัวต่อเกลียว 1 รอบ ในขณะที่แอลฟาฮีลิกซ์ทั่วไปเป็นเกลียววนขวาและมีกรดอะมิโน 3.6 ตัวต่อรอบโมเลกุล คอลลาเจนจะเชื่อมต่อกันทั้งจากปลายและด้านข้างทำให้เกิดคอลลาเจนไฟเบอร์ซึ่งอาจเรียงตัวขนานกันเพื่อให้เกิดความแข็งแรง เช่น เส้นเอ็นหรือเรียงตัวเป็นแขนงและไม่เป็นระเบียบ เช่น ผิวหนัง



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างอันดับ 1, 2 และ 3 ของคอลลาเจน [8]

โครงสร้างที่เรียกว่า "ฮีลิกซ์สามสาย (Triple Helix)" ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.1 โดยภายในสายพอลิเปปไทด์แต่ละสายจะเกิดจากชุดของกรดอะมิโนของ $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$ มาเรียงตัวต่อๆ กันไปเป็นสายของพอลิเมอร์ที่ยาวขึ้น โดย Gly คือ Glycine(Gly) X และ Y ส่วนใหญ่เป็น Proline (Pro) และ 4-Hydroxyproline (Hyp) โดย Hyp เป็นอนุพันธ์ของ Pro ที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH Group) ลงใน Pro โดยอาศัยเอนไซม์และมีโคแฟคเตอร์เป็นกรดแอสคอบิค (Ascorbic Acid) หรือวิตามินซี ช่วยในการเกิดปฏิกิริยาในชุดของกรดอะมิโน นอกจากนั้นโมเลกุลคอลลาเจนที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกันได้คอลลาเจนไฟบริล (Collagen Fibril) และคอลลาเจนไฟบริลรวมกันเป็นคอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen Fiber)

โครงสร้างของคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเกลียวโดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมกันทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงมากขึ้น ความคงตัวมากขึ้น และเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ยากทำให้คอลลาเจนไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งความแข็งแรงของคอลลาเจนยังเกิดจากการสร้างพันธะเชื่อมต่อกันทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลโดยที่สัตว์ที่มีอายุมากจะมีปริมาณพันธะเชื่อมต่อเพิ่มขึ้นจึงทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงมาก [9] คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในกรดหรือเบสเจือจางแต่จะพองตัวและเมื่อความเข้มข้นของกรดหรือเบสมากขึ้นจะทำให้คุณสมบัติการละลายเพิ่มขึ้นเนื่องจากพันธะเชื่อมของคอลลาเจนถูกทำลายบางส่วนแม้ว่าที่สภาวะเป็นกลางคอลลาเจนจะมีโครงสร้างที่แน่นและมีความแข็งแรงมากแต่โมเลกุลเดี่ยวๆ ก็ยังสามารถแยกตัวออกมาได้โดยการลด Ionic Strength และค่า pH ยังเป็นผลให้คอลลาเจนเกิดการพองตัวและละลายในที่สุด อย่างไรก็ตามโมเลกุลดังกล่าวยังคงสภาพเดิม คือ ยังคงมีฮีลิกซ์ 3 สายอยู่และหากทำให้สภาวะดังกล่าวกลับมาอยู่ในสภาวะเดิมก็มีความเป็นไปได้ที่คอลลาเจนจะสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้แต่สิ่งสำคัญที่ต้องหลีกเลี่ยง คือ ความร้อนเนื่องจากฮีลิกซ์จะเสียสภาพที่อุณหภูมิระหว่าง 35-40 องศาเซลเซียส สิ่งนี้เป็นสิ่งที่บ่งชี้อุณหภูมิในการหดตัวของคอลลาเจนและจะเกิดอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิวิกฤตซึ่งตรวจวัดโดย Pyrrolidine-Residue (Proline and Hydroxyproline) Content ในคอลลาเจน เช่น อุณหภูมิวิกฤตในการหดตัวของคอลลาเจนจากปลา เอ็นที่หางหนู และกล้ามเนื้อวัวจะอยู่ที่ประมาณ 45, 61 และ 64 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และถ้าให้ความร้อนสูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนหดตัวได้จะทำให้คอลลาเจนเปลี่ยนเป็นเจลาตินแต่ทั้งนี้ต้องมีน้ำอยู่ด้วยในขณะให้ความร้อน [10]

2.3 ชนิดของคอลลาเจน [11]

ปัจจุบันสามารถแบ่งคอลลาเจนออกเป็น 25 ชนิด โดยการแบ่งประเภทของคอลลาเจนจะมีการแบ่งตามมวลโมเลกุล การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน ความยาวของสายฮีลิกซ์ และคุณสมบัติของส่วนที่ไม่เป็นสายฮีลิกซ์ คอลลาเจนชนิดที่พบมาก คือ คอลลาเจนชนิด Type I คอลลาเจนชนิด Type II คอลลาเจนชนิด Type III และคอลลาเจนชนิด IV ซึ่งในการศึกษามักจะใช้คอลลาเจน Type I เนื่องจากมีปริมาณมากและมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในด้านการแพทย์

ตารางที่ 2.1 ชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ [11]

Collagen Type	Chain Composition	Tissue Distribution
I	$(\alpha 1(I))_2\alpha 2(I)$,trimer$(\alpha 1(I))_3$	skin, tendon, bone, cornea, dentin, fibrocartilage
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	$\alpha 1(V)$ $\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ or $(\alpha 1(V))_2\alpha 2(V)$ or $(\alpha 1(V))_3$	cornea, placental membranes, bone, large vessels, hyaline cartilage, gingival, tendons, interstitial tissues
VI	$\alpha 1(VI)$ $\alpha 2(VI)$ $\alpha 3(VI)$	descemet's membrane, skin, nucleus pulposus, heart muscle, liver, kidney, perichondrium
VII	$(\alpha 1(VII))_3$	skin, placenta, lung, cartilage, cornea, epidermal/dermal junction
VIII	$\alpha 1(VIII)$ $\alpha 2(VIII)$ chain organization of helix unknown	produced by endothelial cells, descemet's membrane
IX	$\alpha 1(IX)$ $\alpha 2(IX)$ $\alpha 3(IX)$	cartilage
X	$(\alpha 1(X))_3$	hypertrophic and mineralizing cartilage
XI	$1\alpha 2\alpha 3\alpha 1$ or $\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)$ $\alpha 3(XI)$	cartilage, intervertebral disc, vitreous humour
XII	$(\alpha 1(XII))_3$	chicken embryo tendon, bovine periodontal ligament, tendons and fibril associated collagen
XIII	unknown	cetal skin, bone, intestinal mucosa, epidermis, hair follicles, and nail root cells

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ [11]

XIV	unknown	same as Type I
XV	unknown	many tissues, homology to Type XVIII
XVI	unknown	under study
XVII	unknown	hemi desmosomes and skin
XVIII	unknown	liver and kidney
XIX	unknown	eyes, brain, testes, and embryonic tissues
XX - XXV	unknown	unknown

คอลลาเจน Type I พบได้เป็นส่วนใหญ่ในสัตว์ชั้นสูงในส่วนของหนัง เอ็น และกระดูก ซึ่งประกอบด้วย 3 สาย ได้แก่ สาย $\alpha 1$(I) จำนวน 2 สายและ $\alpha 2$(I) จำนวน 1 สาย ซึ่งสาย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ จะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันนอกจากนี้อาจพบสาย $\alpha 1$(I) จำนวน 3 สายซึ่งพบได้น้อยมาก

คอลลาเจน Type II พบได้ส่วนใหญ่ในกระดูกอ่อนประกอบด้วยสาย $\alpha 1$(II) จำนวน 3 สาย ซึ่งเชื่อกันว่ามีลักษณะคล้ายสาย $\alpha 1$(I)

คอลลาเจน Type III พบได้ปริมาณน้อย (ประมาณร้อยละ 10) ส่วนใหญ่พบในเส้นเลือด ซึ่งพบว่าคอลลาเจน Type III จะจับกับคอลลาเจน Type I ดังนั้นในการสกัดคอลลาเจนส่วนใหญ่จะพบ Type III ปะปนกับคอลลาเจน Type I เล็กน้อย

คอลลาเจน Type IV มีความจำเพาะเจาะจงมาก ซึ่งพบได้เฉพาะใน Loose Fibrillarnetwork (ร่างแหของเส้นใยฝอยที่เกาะกันหลวมๆ) ใน Basement Membrane (เยื่อแผ่นบางๆ ที่อยู่นอกเซลล์) สำหรับคอลลาเจนชนิดอื่นๆ จะพบในปริมาณที่น้อยมากและมีการเชื่อมโยงกับโครงสร้างทางชีววิทยาที่จำเพาะ ในการศึกษาส่วนใหญ่นิยมศึกษาคอลลาเจน Type I เนื่องจากมีปริมาณมากและมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะทางการแพทย์ [12]

2.4 ประโยชน์ของคอลลาเจน [13]

2.4.1 ทางการแพทย์

คอลลาเจนสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำแผ่นคอลลาเจนและด้วยโครงสร้าง 3 สาย สามารถนำมาใช้ในการรักษาบาดแผลชนิดต่างๆ ซึ่งใช้ได้ดีกับแผลที่ถูกไฟไหม้ระยะที่ 1 และ 2 โดยใช้เป็นผิวหนังเทียมสำหรับผลข้างเคียงของแผ่นคอลลาเจนพบว่าจากการใช้แผ่นคอลลาเจนในเชิง Clinic พบว่ายังไม่มีการรายงานถึงการต่อต้านหรือถูกปฏิเสธจากระบบร่างกาย ดังนั้นสาเหตุที่ใช้แผ่นคอลลาเจนแล้วทำให้บาดแผลหายเร็วเป็นเพราะคอลลาเจนสามารถกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันของเกล็ดเลือดที่ผนังด้านในของเส้นเลือดทำให้เกิดการอุดตันเส้นเลือดฝอยจึงทำให้เกิดการห้ามเลือด และหลังจากนั้นก็เกิดการกระตุ้น Fibroblasts และเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ Macrophages

Lymphocyte และ Monocyte มาที่บาดแผลทำให้มีน้ำเหลืองมากขึ้นและเกิดการสร้างร่างแหเส้นเลือดฝอยขึ้นมาใหม่ทำให้แผลสมานได้อย่างรวดเร็ว

2.4.2 ทางด้านความงาม

คอลลาเจนแท้เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้น ดังนั้นคอลลาเจนแท้ที่มีภาวะเป็นกรด (ASC: Acid Soluble Collagen) จะช่วยทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่นและชุ่มชื้น ดังนี้

2.4.2.1 ช่วยชะลอโครงสร้างทางกายภาพของอายุผิวหนังชั้นหนังแท้ (Dermis)

2.4.2.2 ช่วยกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวใหม่ (Activated Tissue Regeneration)

2.4.2.3 ช่วยลดการระคายเคืองของผิวพรรณ (Reduce Skin Irritation)

2.5 การสกัดพื้นฐาน [14]

การสกัดเป็นเทคนิคที่สำคัญในการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายแยกเอาสารผสมออกจากกันโดยอาศัยความสามารถในการละลายเฉพาะตัวของสารในตัวทำละลายที่ใช้ สารผสมนั้นอาจเป็นสารผสมที่ได้จากปฏิกิริยาเคมีหรือเป็นสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ

2.5.1 ประเภทของการสกัด

2.5.1.1 การสกัดอย่างง่าย (Simple Extraction)

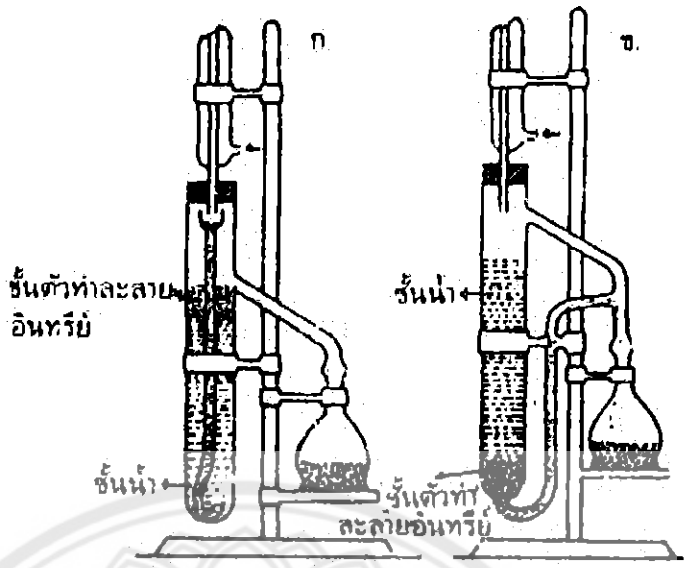
ก. การสกัดอย่างธรรมดา (Ordinary Extraction) วิธีนี้เป็นการสกัดสารอินทรีย์ที่อยู่ในสภาพเป็นสารละลายโดยใช้ตัวทำละลายที่ไม่ละลายในสารละลายนั้นเป็นตัวสกัด เครื่องมือที่ใช้ในการสกัด คือ กรวยแยก (Separatory Funnel)

ข. การสกัดโดยใช้กรดหรือด่าง (Acid and Alkaline Extraction) ในกรณีที่สารอินทรีย์มีสภาพเป็นกรดและปนอยู่กับสิ่งเจือปนจะใช้ด่างสกัด เมื่อกรดละลายในด่างจะทำให้แยกสิ่งเจือปนออกมาได้หรือในทางตรงข้ามถ้าสารอินทรีย์มีสภาพเป็นด่างปนอยู่กับสิ่งเจือปนจะใช้กรดสกัดและเมื่อสารอินทรีย์ที่มีสภาพเป็นด่างละลายในกรดจะทำให้สามารถแยกออกจากสิ่งเจือปนได้ จากนั้นนำสารที่สกัดได้นี้ไปทำให้เป็นกรดในกรณีที่ใช้ด่างสกัดหรือทำให้เป็นด่างในกรณีที่ใช้กรดสกัด

2.5.1.2 การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous Extraction)

ก. Light-Solvent Extraction เครื่องมือนี้เหมาะสำหรับการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่เบากว่าน้ำ

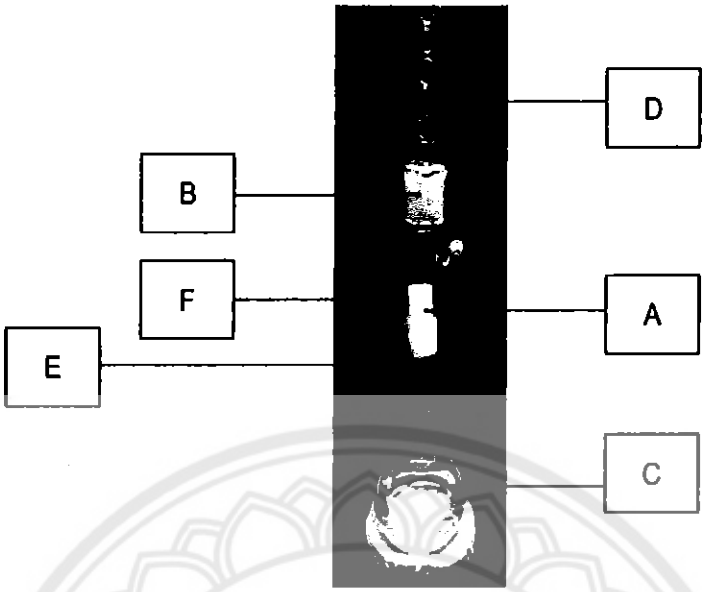
ข. Heavy-Solvent Extraction เครื่องมือนี้เหมาะสำหรับการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่หนักกว่าน้ำ



รูปที่ 2.2 (ก) Light-Solvent Extractor และ (ข) Heavy-Solvent Extractor [14]

ค. Soxhlet Extraction Apparatus อุปกรณ์ชนิดนี้เหมาะสมสำหรับทำการสกัดสารที่เป็นของแข็งโดยใช้ตัวทำละลายที่ร้อนเป็นตัวสกัด ส่วนใหญ่จะนิยมใช้สกัดสารจากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติโดยการเอาของแข็งที่ต้องการสกัดใส่ในภาชนะ A ที่เรียกว่า Porus Thimble (เป็นภาชนะที่มีรูปร่างคล้ายหลอดทดลองที่มีขนาดใหญ่ทำด้วยกระดาษที่มีรูพรุน) ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะ B ที่เรียกว่า Soxhlet Chamber จากนั้นใส่ตัวทาละลายที่ใช้ในการสกัดลงในขวดก้นกลม C เมื่อให้ความร้อนแก่ขวดก้นกลม C จนกระทั่งตัวทำละลายเดือดกลายเป็นไอ ไอของตัวทำละลายจะผ่านเข้าไปหลอด E และเข้าสู่เครื่องควบแน่น D แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลวลงสู่ Thimble A พร้อมกับละลายสารจากของแข็งที่อยู่ใน Thimble A ลงมาใน Chamber เมื่อระดับของเหลวใน Chamber สูงจนถึงระดับของหลอด F ซึ่งเรียกว่า Siphon Arm ของเหลวนี้จะไหลจาก Chamber ลงสู่ขวดก้นกลม C อีกครั้งหนึ่งพร้อมกับนำสารที่สกัดได้จากของแข็งใน Thimble A ลงสู่ขวดก้นกลมด้วยซึ่งกระบวนการสกัดนี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งได้สารอินทรีย์ออกมามากพอแล้วจึงหยุดสกัดดังรูปที่ 2.3

เทคนิคในการนำเอาสารอินทรีย์ออกจากตัวทำละลายที่อยู่ในขวดก้นกลม C สามารถทำได้หลายเทคนิคขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เช่น การระเหยตัวทำละลายโดยการใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ (Rotatory Evaporator) หรือเทคนิคการกลั่น เป็นต้น



รูปที่ 2.3 Soxhlet Extraction Apparatus [14]

2.5.2 ตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด [15]

2.5.2.1 ชนิดของตัวทำละลาย ต้องเหมาะสมกับการสกัดสารที่สนใจโดยอาศัยหลักการ Like Dissolve Like

2.5.2.2 ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้สกัด ปริมาตรตัวทำละลายต้องมีมากพอ คือ เมื่อตัวทำละลายส่วนหนึ่งเกิดการระเหยขึ้นไปสกัดสารก่อนที่จะเต็ม Reflux Sidearm แล้วจากนั้นจะเป็นแบบลักษณะของกาลักน้ำ ต่อไปในส่วนของ Flask ก็จะต้องมีตัวทำละลายเหลืออยู่เพื่อทำให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา ซึ่งตัวทำละลายที่มากเกินพอสามารถระเหยออกได้เมื่อสกัดสารที่สนใจได้ตามที่ต้องการด้วยเครื่อง Rotary Evaporator

2.5.2.3 เวลาที่ใช้สกัด เวลาที่ใช้สกัดต้องมีความเหมาะสมที่จะสามารถสกัดเอาสารที่สนใจออกจากตัวอย่างให้ได้มากที่สุด ซึ่งในเทคนิคนี้ส่วนใหญ่เวลาที่ใช้สกัดมักยาวนานเป็นชั่วโมง เพื่อให้เกิดการ Reflux ของตัวทำละลายหลายๆ ซ้ำทำให้สารที่สนใจถูกสกัดออกจากตัวอย่างได้มากที่สุด

2.5.2.4 ตัวอย่าง เทคนิคนี้ตัวอย่างมักจะเป็นของแข็ง ดังนั้นต้องทำตัวอย่างให้มีพื้นผิวสัมผัสกับสารมากที่สุด คือ พยายามสับหรือหั่นให้ตัวอย่างมีขนาดเล็กที่สุดเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส ข้อดีของการสกัดแบบง่าย คือ เป็นเทคนิคที่มีราคาถูก (เฉพาะราคาตัวทำละลาย) ค่อนข้างทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยากมากนัก ข้อด้อย คือ ใช้เวลาสกัดนานอาจมีการตกค้างของตัวทำละลายและมีตัวทำละลายอินทรีย์เหลือเป็น Waste หลังจากกระบวนการเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้มักมีความเป็นพิษทั้งต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม (ในกรณีที่ทิ้งแบบที่ไม่มีการจัดการที่ดี)

2.6 การสกัดคอลลาเจน [16]

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธีโดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกไปเสียก่อนแล้วจึงทำให้คอลลาเจนที่มีอยู่ละลายออกมา ซึ่งการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดคอลลาเจนมีด้วยกันหลายวิธีขึ้นกับวัตถุดิบเริ่มต้นว่ามีองค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากเท่าไร ซึ่งสามารถสรุปได้พอสังเขป ดังนี้ การล้างทำความสะอาด การกำจัดโปรตีนบริเวณผิวหน้า การกำจัดไขมัน การกำจัดแคลเซียม การกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน และการกำจัดเม็ดสี ส่วนการสกัดคอลลาเจนที่มีอยู่ให้ละลายออกมาก็ทำได้หลายวิธีขึ้นกับอายุของสัตว์และชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัด

คอลลาเจนสามารถสกัดได้จากกระดูกสัตว์ที่ขจัดแร่ธาตุแล้ว หนังสุกร หนังโค หนังปลา และในประเทศจีนยังใช้หนังปลาเป็นวัตถุดิบในการสกัดเจลาตินอย่างแพร่หลาย การปรับสภาพวัตถุดิบคอลลาเจนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์ละลายได้ช้ามากแม้ในน้ำเดือด เนื่องจากคอลลาเจนมีพันธะเชื่อมต่อตามธรรมชาติ ดังนั้นก่อนการสกัดจึงต้องปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อทำลายพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนท์และทำลายการจัดเรียงตัวของโปรตีนทำให้โปรตีนพองตัว ซึ่งง่ายต่อการทำลายพันธะทั้งภายในและภายนอกโมเลกุลของคอลลาเจน การปรับสภาพวัตถุดิบนิยมใช้สารละลายกรดหรือด่างที่เจือจางมาก ซึ่งจะทำลายเฉพาะพันธะที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลส่วนการสลายพันธะภายในโมเลกุลของคอลลาเจนจะเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ระยะเวลาการปรับสภาพขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์ วัตถุดิบจากสัตว์ที่มีอายุมากต้องปรับสภาพนานกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อยเนื่องจากพันธะที่เชื่อมต่อโมเลกุลคอลลาเจนของสัตว์ที่มีอายุมากจะแข็งแรงกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย ส่วนหนังหมูซึ่งมีปริมาณไขมันสูงควรปรับสภาพด้วยกรด นอกจากการปรับสภาพด้วยกรดและด่างแล้วยังสามารถใช้เอนไซม์ร่วมในการทำลายพันธะเชื่อมขวางโดยเอนไซม์ที่ใช้จะต้องเป็นคอลลาจีเนสชนิดพิเศษ เนื่องจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยทั่วไปไม่สามารถย่อยคอลลาเจนในรูปธรรมชาติได้ ดังนั้นร่างกายคนจึงสามารถย่อยเจลาตินได้แต่ย่อยคอลลาเจนไม่ได้ คอลลาเจนที่ใช้ในอาหารส่วนใหญ่จะผลิตจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์ (วัวหรือหมู) เช่น ไขข้อกระดูก ข้อต่อ กระดูกอ่อน เอ็น หนัง กระดูก เป็นต้น นอกจากนี้ก็ยังมีคอลลาเจนที่ผลิตจากหนังปลาทะเลน้ำลึกหรือปลาหมึก

การผลิตคอลลาเจนใช้อุณหภูมิสูงๆ ไม่ได้เพราะจะทำให้คอลลาเจนสลายตัวไปเป็นเจลาตินจึงต้องใช้อุณหภูมิต่ำ (ไม่เกิน 37 องศาเซลเซียส) ย่อยสลายด้วยเอนไซม์หรือกรดด่างอ่อนๆ และแยกด้วยการกรองคอลลาเจน และเจลาตินเป็น Macromolecule เดียวกันแต่มีรูปแบบต่างกันการสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้คอลลาเจนละลายโดยไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างฮีลิกซ์สามสาย (Triple Helix) ของคอลลาเจนแต่หากใช้อุณหภูมิสูงขึ้นความร้อนจะสลายพันธะไฮโดรเจนและโควาเลนท์ เช่น พันธะเอไมด์ทำให้ฮีลิกซ์สามสาย (Triple Helix) ไม่เสถียรและเกิด Helix-to-Coiltransition ได้เป็นเจลาติน โมเลกุลของเจลาตินมีหลายขนาดผสมกันตั้งแต่ 16-150 กิโลดาลตัน อุณหภูมิที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้เจลาตินซึ่งละลายอยู่ในรูป Random

Coil อย่างไรก็ตามบางตำแหน่งของเจลาตินยังคงรูปร่างเป็นฮีลิกซ์ (Helix) ขึ้นกับจำนวน Pyrrolidine Residues คือ โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนในเจลาติน

2.6.1 การสกัดโดยใช้กรด [17]

กระบวนการที่สกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดเนื่องจากคอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในกรดหรือเบสเจือจางแต่จะพองตัวและเมื่อความเข้มข้นของกรดหรือเบสมากขึ้นจะทำให้คุณสมบัติการละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากพันธะเชื่อมของคอลลาเจนถูกทำลายบางส่วนแม้ว่าที่สภาวะเป็นกลางคอลลาเจนจะมีโครงสร้างที่แน่นและมีความแข็งแรงมากแต่โมเลกุลเดี่ยวๆ ก็ยังสามารถแยกตัวออกมาได้โดยการลด Ionic Strength และค่า pH ซึ่งเป็นผลให้คอลลาเจนเกิดการพองตัวและละลายในที่สุด ซึ่งจะมีทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง คือ กระบวนการไฮโดรไลซิสซึ่งมีข้อมูล ดังนี้

ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเกลือกับน้ำแล้วทำให้ได้สารละลายที่มีสมบัติเป็นกรดเบสหรือกลางเกิดขึ้นและปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของเกลือ หมายถึง ปฏิกิริยาระหว่างเกลือหรือไอออนจากเกลือกับน้ำแล้วเกิด H_3O^+ หรือ OH^- ทำให้สารละลายมีสมบัติเป็นกรดหรือเบส

เกลือ (Salt) คือ สารประกอบไอออนิกที่ประกอบด้วยไอออนบวกที่เกิดจากโลหะหรือเทียบเท่าโลหะ (NH_4^+) กับไอออนลบที่เกิดจากอโลหะเมื่อนำเกลือไปละลายน้ำ เกลือบางชนิดไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำทำให้สารละลายมีสมบัติเป็นกลางหรือมี pH=7 แต่เกลือบางชนิดทำปฏิกิริยากับน้ำหรือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสได้ H_3O^+ หรือ OH^- เกิดขึ้น ทำให้สารละลายมีสมบัติเป็นกรดหรือเป็นเบส ซึ่งแสดงดังสมการ

$$NH_4Cl\ (aq) \quad <------> \quad NH_4^+\ (aq) + Cl^-\ (aq) \qquad (2.1)$$

$$NH_4^+ + H_2O \quad <------> \quad H_3O^+ + NH_3 \qquad (2.2)$$

จากสมการข้างต้นถ้าในกรณีนี้ $H_3O^+ > OH^-$, ค่า pH<7 สารละลายที่ได้จะมีสมบัติเป็นกรด

$$CH_3COONa\ (aq) \quad <------> \quad CH_3COO^-\ (aq) + Na^+\ (aq) \qquad (2.3)$$

$$CH_3COO^-\ (aq) + H_2O \quad <------> \quad CH_3COOH\ (aq) + OH^-\ (aq) \qquad (2.4)$$

จากสมการข้างต้นถ้าในกรณีนี้ $OH^- > H3O^+$, ค่า pH>7 สารละลายที่ได้จะมีสมบัติเป็นเบส

$$NaNO_3(aq) \quad <------> \quad Na^+(aq) + NO_3^-(aq) \qquad (2.5)$$

จากสมการข้างต้นถ้าในกรณีนี้ NO_3^- เป็นคู่เบสของกรดแก่ไม่สามารถรับ H^+ ได้ เช่นเดียวกับ Na^+ สารละลายที่ได้จึงมีสมบัติเป็นกลาง

การไฮโดรไลซิสเกลือ คือ การเอาเกลือมาทำปฏิกิริยากับน้ำจะแบ่งเกลือตามลักษณะการไฮโดรไลซิสได้ ดังนี้

2.6.1.1 เกลือที่เกิดจากกรดแก่ เบสแก่ จะเป็นเกลือกลางเพราะไอออนทั้งสองไม่ทำปฏิกิริยากับ H_2O

2.6.1.2 เกลือที่เกิดจากกรดแก่ เบสอ่อน จะเป็นเกลือกรดเพราะไอออนของเบสอ่อนจะไปทำปฏิกิริยากับน้ำ

2.6.1.3 เกลือที่เกิดจากกรดอ่อน เบสแก่ จะเป็นเกลือเบสเพราะไอออนของกรดอ่อนจะไปทำปฏิกิริยากับน้ำ

2.6.1.4 เกลือที่เกิดจากกรดอ่อน เบสอ่อน เช่น NH_4CN เมื่อละลายน้ำไอออนของกรดอ่อน เบสอ่อน จะไปรวมกับน้ำ

2.6.2 การสกัดโดยใช้เอนไซม์ [18]

กระบวนการที่สกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์โดยเอนไซม์ คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพเป็นสารประกอบพวกโปรตีนสามารถลดพลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยา เอนไซม์จะเร่งเฉพาะชนิดของปฏิกิริยาและชนิดของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา

สมการแสดงกลไกในการทำงานของเอนไซม์

$$E + S \quad <------> \quad ES \qquad (2.6)$$

เอนไซม์ สับสเตรท สารก่อกัมมันต์เอนไซม์ – สับสเตรท

$$ES \quad ------> \quad P + E \qquad (2.7)$$

เอนไซม์ ผลิตภัณฑ์

เมื่อ E คือ เอนไซม์ (Enzyme)

S คือ สับสเตรท (Substrate)

P คือ ผลิตภัณฑ์ (Product)

ES คือ สารมัธยันตร์เอนไซม์ - สับสเตรท (Enzyme-Substrate Intermediate)

ในการเกิด ES และการสลายตัวของ ES กลับไปเป็นโมเลกุลของเอนไซม์และสับสเตรทนั้นเกิดขึ้นได้เร็วมาก ส่วนการเกิดสารผลิตภัณฑ์ในขั้นที่สองนั้นจะเกิดได้ช้ากว่าจึงเป็นขั้นกำหนดอัตรา

2.6.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ [18]

ก. ความเข้มข้นของซับสเตรท เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรทเพิ่มขึ้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่มีความเร็วสูงสุด ในกรณีที่มีซับสเตรทเพียงชนิดเดียวและความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ หลังจากนั้นแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็ไม่เพิ่มขึ้น ในบางกรณีความเข้มข้นของซับสเตรทที่สูงเกินไปอาจยับยั้งปฏิกิริยาทำให้อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาลดลงได้

ข. ความเข้มข้นของเอนไซม์ อัตราเร็วของปฏิกิริยามักจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์เมื่อมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของซับสเตรท ค่าพีเอช และอุณหภูมิคงที่ ยกเว้นในกรณีต่างๆ ดังนี้ คือ อัตราการละลายของซับสเตรทมีขีดจำกัด เช่น การละลายของออกซิเจนในระบบที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน การผันแปรสมบัติของซับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์จนทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือการที่โคแฟคเตอร์ที่จำเป็นสำหรับเอนไซม์แตกตัวออกจากเอนไซม์ เป็นต้น

ค. ค่า pH เอนไซม์ส่วนใหญ่จะเร่งปฏิกิริยาได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4-10 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 4 หรือสูงกว่า 10 จะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างถาวรยกเว้น เพปซิน เรนนิน และอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ทุกชนิดเป็นโปรตีนการเปลี่ยนแปลงพีเอชมีผลต่อประจุบนโมเลกุลของโปรตีนจึงมีผลต่อการทำงานที่บริเวณเร่ง (Active Site) ของเอนไซม์และจะมีผลสูงสุดเมื่อมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนหรือไฮดรอกซิลไอออนมากจนถึงจุดพีไอ ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลแบบตติยภูมิของโปรตีนถูกทำลายจึงทำให้การรวมตัวของเอนไซม์กับซับสเตรทที่บริเวณเร่งไม่สามารถเกิดขึ้นได้เอนไซม์แต่ละชนิดมีค่าพีเอชที่เหมาะสม

ฅ. อุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้สารที่ทำปฏิกิริยามีพลังงานมากพอที่จะทำให้สารนั้นกลายเป็นสารที่ถูกกระตุ้นแล้วมีพลังงานสูงอยู่ในสภาพที่จะเปลี่ยนไปเป็นผลิตผลอย่างรวดเร็ว การเพิ่มอุณหภูมิจึงทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นแต่การเพิ่มอุณหภูมิทำให้โปรตีนซึ่งมีโครงรูปสามมิติที่ต้องจัดเรียงตัวของหมู่ต่างๆ ในโมเลกุลโดยเฉพาะบริเวณเร่งให้พอเหมาะแก่การจับกับซับสเตรทแล้วเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลผลิตได้เมื่อมีอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนแปลงสภาพจากธรรมชาติจึงทำให้เอนไซม์มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาลดลงหรือเสียไป

ง. แอกติวิตีของน้ำ การทำงานเอนไซม์โดยทั่วไปจะเกิดได้ดีเมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นสารละลายในน้ำยกเว้นเอนไซม์บางชนิด เช่น ไรโบนิวเคลียเอสและไลโซไซม์ เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายทั้งเอนไซม์และซับสเตรทจึงทำให้มีการการชนกันของโมเลกุลทั้ง 2 ชนิด จนสามารถจับตัวกันได้ยิ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส น้ำยังทำหน้าที่เป็นซับสเตรทด้วยปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดีเมื่อมีค่าแอกติวิตีของน้ำค่อนข้างสูง

จ. โคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ เอนไซม์จำนวนมากจะเร่งปฏิกิริยาได้ต่อมีโคแฟคเตอร์ร่วมทำงานด้วย เช่น พอลิฟีนอลออกซิเดสต้องมีไอออนของทองแดง แอลฟา-อะไมเลสต้องมีไอออนของแคลเซียม เป็นต้น หากขาดโคแฟคเตอร์ก็จะทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้

ฉ. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป็นสารที่มีผลทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาลดลง เช่น ทริปซินอินฮิบิเตอร์ที่พบในถั่วเหลือง ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน

2.7 องค์ประกอบและโครงสร้างของหมู [19]

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

2.7.1 กระดูก

กระดูก (Bone) เป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เป็นแกนหรือเป็นโครงสร้างให้แก่ร่างกาย ในกระดูกมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุด กระดูกประกอบด้วยเซลล์เส้นใยและสารระหว่างเซลล์ซึ่งเป็นแคลเซียมเกือบทั้งหมด ดังนั้นจึงทำให้กระดูกมีลักษณะเป็นของแข็งที่เสริมสร้างกันเองขึ้นเป็นโครงร่างของร่างกายสัตว์และเป็นหลักให้กล้ามเนื้อ และเอ็นสามารถยึดติดเข้าด้วยกันเป็นรูปร่างของสัตว์ และช่วยให้สัตว์สามารถเคลื่อนไหวไปมาได้ กระดูกมี 2 ลักษณะ ได้แก่ กระดูกโปร่ง (Spongy Bone) และกระดูกแข็ง (Compact) ส่วนของกระดูกโปร่งมีลักษณะโปร่งมีเส้นใยกระดูกและส่วนที่สร้างเม็ดเลือดอยู่ภายใน ส่วนกระดูกแข็งมีลักษณะเป็นแท่งทึบแน่นภายในกลวงแต่มีความแข็งมากในร่างกายสัตว์มีกระดูกที่มีรูปร่างยาวๆ เช่น 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 แต่มีสีออกเหลืองมีความขุ่นม้วมากกว่าและยืดหยุ่นได้มากกว่าไฮอาลีนพบได้ที่บริเวณโคนหู เป็นต้น

2.7.2.3 **กระดูกอ่อนไฟโบร (Fibro Cartilage)** เป็นกระดูกอ่อนที่ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนในเมทริกซ์สูงที่สุดและมีความสำคัญในการทำให้เอ็นเชื่อมติดกับกระดูกได้ ซึ่งจะพบกระดูกอ่อนไฟโบรในช่องระหว่างข้อของกระดูกสันหลัง และบริเวณสัน (Ridge) ของกระดูกสะบัก (Scapula) และกระดูกเชิงกราน (Pelvis)

2.7.3 **กล้ามเนื้อโครงร่างและเส้นใยกล้ามเนื้อ**

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

2.7.3.1 กล้ามเนื้อ เมื่อมองดูกล้ามเนื้อทั้งก้อนด้วยตาเปล่าจะเห็นว่าถูกห่อหุ้มด้วยชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นนอกที่เรียกว่า "อิพิไมเซียม (Epimysium)" กล้ามเนื้อประกอบด้วยมัดกล้ามเนื้อหลายๆ 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)** เป็นส่วนที่ประกอบกันเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อ ภายในเส้นใยย่อยมีเส้นใยฝอย (Myofilament) ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ เส้นใยฝอยชนิดหนาที่เรียกว่า "ไมโอซิน" และเส้นใยฝอยชนิดบางซึ่งเรียกว่า "แอกทิน" ในเส้นใยย่อยแต่ละเส้นมีเส้นใยไมโอซินและเส้นใยแอกทินซ้อนสลับกันไปจึงทำให้เกิดเป็นแถบทึบสลับกับแถบโปร่งแสงไปตลอดความยาวของเส้นใยย่อย ดังนั้นเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงมองเห็นกล้ามเนื้อมีลักษณะเป็นลาย

2.7.4 เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) เป็นส่วนของเนื้อเยื่อที่กระจายอยู่ทั่วไปในกล้ามเนื้อมีหน้าที่ห่อหุ้มกล้ามเนื้อเชื่อม และยึดส่วนประกอบของกล้ามเนื้อให้ติดกัน และยังเชื่อมกล้ามเนื้อให้ติดกับกระดูก องค์ประกอบและโครงสร้างส่วนใหญ่ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีลักษณะที่ไม่ใช่เซลล์ ดังนั้นจึงเรียกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันว่าเป็นสารนอกเซลล์ (Extracellular Substance) เนื้อเยื่อเกี่ยวพันถูกแบ่งตามลักษณะโครงสร้างได้เป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะที่เป็นของเหลวเหนียวข้นและมีความหนืดสูงโดยมีไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญอยู่ในส่วนของเซลล์เส้นใย และสารระหว่างเซลล์ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารช่วยหล่อลื่น และยังเป็นเกราะป้องกันการแทรกซึมของเชื้อโรคภายนอก 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) เป็นเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มเส้นใยกล้ามเนื้อชั้นเอนโดไมเซียมมีเส้นเลือดฝอยอยู่ด้วยเพื่อทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปสู่เซลกล้ามเนื้อโดยมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางส่วนทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของหลอดเลือดมีเส้นใยเรติคิวลาร์ (Reticular Fiber) ที่สานตัวกันเป็นร่างแหอยู่รอบๆ ช่วยทำให้เอนโดไมเซียมเชื่อมติดอยู่กับชั้นของซาร์โคเลมมาของเส้นใยกล้ามเนื้อได้ กล้ามเนื้อสัตว์ที่มีอายุมากจะเหนียวกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อยเนื่องจากสัตว์ที่มีอายุจะมีปริมาณตัวเชื่อมระหว่างโมเลกุลคอลลาเจนสูงกว่าจึงเป็นสาเหตุให้เนื้อเหนียวกว่าทั้งที่กล้ามเนื้อของสัตว์อายุน้อยจะมีปริมาณคอลลาเจนสูงกว่าก็ตาม เช่น เนื้อส่วนขาและสะโพกของหมูจะมีความเหนียวมากกว่าของลูกหมู เป็นต้น

2.7.5 เนื้อเยื่อไขมัน

เนื้อเยื่อไขมัน (Adipose Tissue) เป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งของกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมันมีหน้าที่หลายประการ ได้แก่ เป็นแหล่งสะสมของอาหารประเภทไขมันที่สำคัญ เช่น กรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย เนื้อเยื่อไขมันยังเป็นแหล่งของสารอาหารที่ละลายได้ในไขมัน เช่น วิตามินที่ละลายในไขมัน เป็นต้น นอกจากนี้ไขมันที่อยู่บริเวณถัดจากชั้นของผิวหนังจะช่วยป้องกันการสูญเสียความร้อนของร่างกาย ช่วยทำให้ร่างกายสัตว์สามารถทนต่อสภาพอากาศซึ่งเปลี่ยนอยู่เสมอรวมทั้งช่วยป้องกันอันตรายให้กับอวัยวะภายในต่างๆ เช่น ไขมันที่ห่อหุ้มไต เป็นต้น

มักพบเนื้อเยื่อไขมันในลักษณะที่เป็นไขมันใต้ผิวหนัง ไขมันแทรกอยู่ระหว่างมัดกล้ามเนื้อและไขมันในมัดกล้ามเนื้อซึ่งอยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้ง 3 ชนิด

2.7.5.1 ไขมันใต้ผิวหนัง (Subcutaneous Fat) หรือในบางครั้งอาจพบอยู่เหนือชั้นของอิพิไมเซียมที่ห่อหุ้มกล้ามเนื้อ ไขมันในชั้นใต้ผิวหนังทำหน้าที่ช่วยป้องกันการสูญเสียความร้อนออกจากร่างกายสัตว์ ได้แก่ ส่วนมันแข็งของสุกร (Back Fat หรือ Subcutaneous Fat)

2.7.5.2 ไขมันแทรกอยู่ระหว่างมัดกล้ามเนื้อ (Intramuscular Fat or Seam Fat) หรือไขมันที่ห่อหุ้มมัดกล้ามเนื้อเป็นชั้นไขมันที่อยู่ในชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพอริไมเซียม สามารถมองเห็นไขมันชั้นนี้ได้ชัดและสามารถแยกออกได้ง่าย เช่น ไขมันในช่องท้องและไขมันรอบๆ อวัยวะภายใน เป็นต้น

2.7.5.3 ไขมันในมัดกล้ามเนื้อ (Intramuscular Fat) พบอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นเอนโดไมเซียมซึ่งห่อหุ้มเส้นใยกล้ามเนื้อทำให้มองเห็นชั้นของไขมันนี้แทรกกระจายอยู่ในมัดกล้ามเนื้อจึงอาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า "ไขมันแทรก (Marbling Fat)" เมื่อมองหน้าตัดของกล้ามเนื้อจะพบไขมันแทรกเป็นจุดขนาดเท่าไส้ดินสอขนาดเล็กกระจายตัวทั่วหน้าตัดของเนื้อ ปัจจุบันผู้บริโภคมักนิยมบริโภคไขมันแทรกปริมาณปานกลางจนถึงต่ำ

2.7.6 กล้ามเนื้อเรียบ

กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth Muscle) เป็นส่วนประกอบของเนื้อสัตว์ในปริมาณต่ำเส้นใยกล้ามเนื้อเรียบมีรูปร่างยาวเป็นรูปกระสวยซึ่งมีความยาว 0.2-4.0 มิลลิเมตร เมื่อส่องดูเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจะเห็นว่ามีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางของเส้นใยกล้ามเนื้อ ส่วนเส้นใยแอกทินและไมโอซินของกล้ามเนื้อเรียบจะอยู่รวมกันอย่างไม่เป็นระเบียบและมองเห็นเป็นรูปร่างไม่ชัดเจนจึงเรียกกล้ามเนื้อนี้ว่า "กล้ามเนื้อเรียบ" ซึ่งจะพบกล้ามเนื้อเรียบได้ในบริเวณผนังของเส้นเลือด ผนังลำไส้ และพบกล้ามเนื้อเรียบอยู่ร่วมกับกล้ามเนื้อโครงร่างในอวัยวะบางชนิด ได้แก่ ลิ้นและกระเพาะอาหาร

2.7.7 กล้ามเนื้อหัวใจ

กล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac Muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่มีคุณสมบัติพิเศษแตกต่างจากกล้ามเนื้ออื่น กล้ามเนื้อหัวใจมีการทำงานหรือเต้นเป็นจังหวะตลอดเวลาไม่หยุดตั้งแต่เริ่มมีชีวิตจนกระทั่งสัตว์ตาย กล้ามเนื้อหัวใจนี้มีส่วนที่คล้ายกับทั้งกล้ามเนื้อโครงร่างและกล้ามเนื้อเรียบโดยมีนิวเคลียสอยู่ในใจกลางเซลล์และทำงานนอกเหนือการควบคุมของสมองเช่นเดียวกับกล้ามเนื้อเรียบ แต่มีส่วนที่คล้ายกับกล้ามเนื้อโครงร่างโดยมีเส้นใยฝอยแอกทินและไมโอซินที่เรียงตัวสลับอยู่ด้วยกัน จึงทำให้มีความลายคล้ายกับในเส้นใยของกล้ามเนื้อโครงร่าง เส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจมีรูปร่างเฉพาะที่เป็นกิ่งสาขาโดยจะประกอบด้วยเส้นใยลำต้น ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าเส้นใยกล้ามเนื้อโครงร่างและส่วนของเส้นใยที่เป็นสาขาก็มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าเส้นใยลำต้น กล้ามเนื้อหัวใจประกอบด้วยเส้นใยฝอยแอกทินและไมโอซินเรียงกันเป็นกลุ่มหนาแน่นซึ่งมองเห็นได้ชัดกว่าใน

กล้ามเนื้อเรียบและเมื่อมองตามความยาวแล้วจะเห็นว่ามีความลายปรากฏอยู่จึงอาจเรียกกล้ามเนื้อหัวใจว่าเป็นกล้ามเนื้อลายได้ เมื่อเปรียบเทียบกล้ามเนื้อโครงร่างหรือกล้ามเนื้อลาย กล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อหัวใจจะสังเกตเห็นลักษณะที่คล้ายกันและแตกต่างกัน

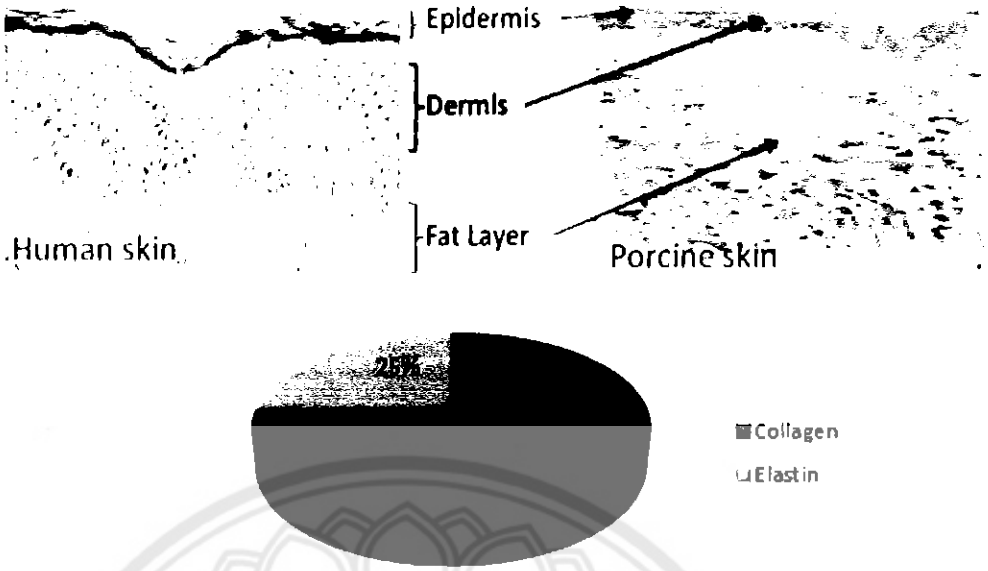
2.7.8 ระบบเส้นเลือดและระบบประสาท

ระบบเส้นเลือด (Blood System) เป็นทางเดินของเส้นเลือดที่ไปสู่กล้ามเนื้อโดยการผ่านไปตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอิพิไมเซียมและเพอริไมเซียม เส้นเลือดจะแตกแขนงออกเป็นเส้นเลือดฝอยแผ่กระจายไปตามส่วนต่างๆ ของเส้นใยกล้ามเนื้อโดยมีเส้นเลือดแดง (Artery) เป็นทางนำอาหาร น้ำและออกซิเจนมาสู่เส้นใยกล้ามเนื้อและเส้นเลือดดำ (Vein) ทำหน้าที่ขนถ่ายของเสียออกจากเส้นใยกล้ามเนื้อ ระบบประสาท (Nervous System) เป็นส่วนของเนื้อเยื่อที่เชื่อมโยงติดต่อกับกล้ามเนื้อต่างๆ ในร่างกายเพื่อควบคุมการทำงานจึงอาจเรียกระบบประสาทว่า "เนื้อเยื่อประสาท" ก็ได้ เนื้อเยื่อประสาทมีประมาณร้อยละ 1 แม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยแต่จัดเป็นส่วนที่มีผลต่อคุณภาพของเนื้อมากที่สุดโดยเฉพาะระหว่างขั้นตอนการทำให้สัตว์สลบรวมทั้งในขั้นตอนการแทงคอเอาเลือดออกเช่นกัน

2.7.9 เนื้อเยื่อผิวหนัง

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

ผิวหนังของหมูจะห่อหุ้มร่างกายไว้ทั้งหมด ซึ่งทำหน้าที่ปกป้องอวัยวะต่างๆ ที่อยู่ใต้ลงไปจากความร้อน แสง การติดเชื้อ และสภาพแวดล้อมทั้งหลาย นอกจากนี้มันยังทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ เป็นที่กักเก็บน้ำ และไขมัน มีปลายประสาทรับรู้ความรู้สึก ป้องกันการสูญเสียน้ำ ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ผิวหนังทั่วทั้งร่างกายจะมีความแตกต่างกันไปทั้งสี ความหยาบละเอียด และความหนา ซึ่งผิวหนังจะประกอบไปด้วยชั้นต่างๆ ซึ่งแต่ละชั้นก็มีหน้าที่ที่แตกต่างกันไปดังนี้



รูปที่ 2.4 แสดงการเปรียบเทียบผิวหนังของคนกับผิวหนังของหมู [19]

2.7.9.1 ชั้นอีพิเดอมีส (Epidermis) เป็นชั้นหนังกำพร้าจัดเป็นผิวหนังชั้นนอกสุด ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยโปรตีนที่ช่วยทำให้โครงสร้างผิวแข็งแรงและมีความยืดหยุ่น ซึ่งผิวหนังชั้นนี้จะทำหน้าที่ป้องกันส่วนต่างๆ ภายในร่างกาย ป้องกันสิ่งแปลกปลอมภายนอกไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังป้องกันการสูญเสียของน้ำออกจากร่างกายด้วย เป็นชั้นที่มีคอลลาเจนปะปนอยู่แต่มีในปริมาณที่ไม่มากเท่าชั้นหนังแท้

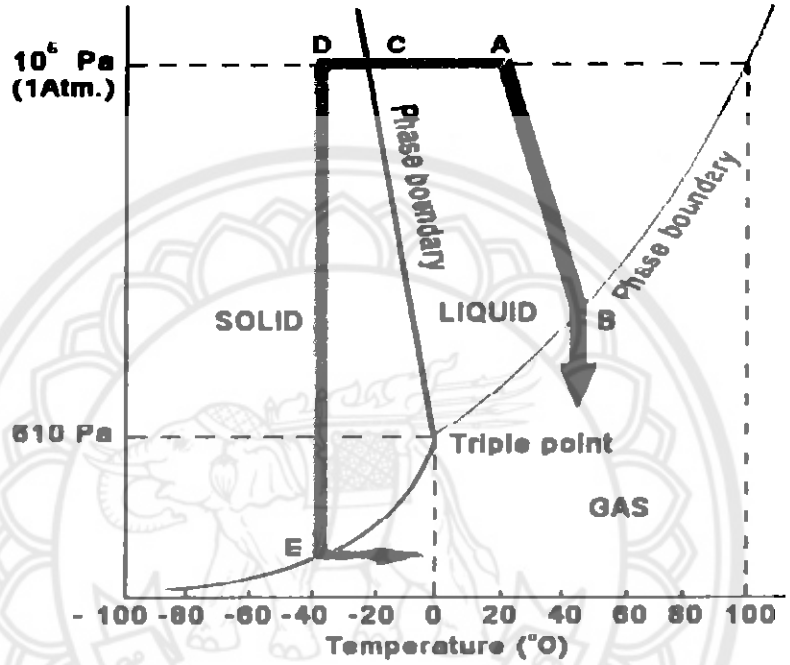
2.7.9.2 ชั้นเดอมิส (Dermis) เป็นชั้นที่อยู่ตรงกลางจัดว่าเป็นชั้นหนังแท้ซึ่งชั้นนี้จะมีหลอดเลือดขนาดเล็กมาหล่อเลี้ยง ท่อน้ำเหลือง รากขน ต่อมเหงื่อ ซึ่งผิวหนังในชั้นนี้จะประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนเซลล์ไฟโบรบลาส (Fibroblast) ซึ่งเป็นตัวที่สร้างเส้นใยคอลลาเจนและอีลาสติน (Elastin) เส้นประสาทชั้นเดอมีสนี้จะถูกยึดเข้าหากันด้วยเส้นใยคอลลาเจนจึงทำให้ผิวหนังชั้นนี้มีปลายประสาทรับความรู้สึกเจ็บและการสัมผัสได้

2.7.9.3 ชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (Subcutaneous Fat Layer) เป็นชั้นที่อยู่ลึกที่สุด ผิวหนังชั้นนี้จะมีเครือข่ายของเส้นใยคอลลาเจนและมีเซลล์ไขมันประปนอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งเซลล์ไขมันเหล่านี้จะช่วยในการเก็บสะสมพลังงานความร้อนไม่ให้สูญเสียออกนอกร่างกายและช่วยปกป้องร่างกายด้วยการดูดซับแรงกระแทกจากภายนอก แต่ในหมูชั้นนี้เป็นชั้นที่พบคอลลาเจนน้อยที่สุด เพราะเนื่องจากมีส่วนของชั้นไขมันปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก

2.8 การทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Drying) [20]

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) หรือการทำแห้งแบบระเหิด (Sublimation Drying) มีชื่อเรียกเฉพาะว่า “Lyophilization” เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำจึงช่วยให้ผลิตภัณฑ์คงคุณภาพทางโภชนาการเนื้อสัมผัสโครงสร้าง สี

กลิ่น และรสชาติได้ใกล้เคียงกับของสด ผลิตภัณฑ์ที่นิยมนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง เช่น อาหาร เครื่องสำอางค์ ยา และผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ เป็นต้น เนื่องจากการทำแห้งแบบเยือกแข็งนี้มีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงทั้งเงินทุนตั้งต้นและค่าใช้จ่ายดำเนินการ ดังนั้นการเลือกใช้เทคโนโลยีจึงต้องพิจารณาความต้องการของตลาดและปัจจัยสนับสนุนอื่นๆ ควบคู่กันไปด้วย



รูปที่ 2.5 หลักพื้นฐานของกระบวนการทำแหง [20]

หลักพื้นฐานของกระบวนการทำแห้งชนิดต่างๆ สามารถอธิบายได้จากแผนภูมิสถานะ (Phase Diagram) ของน้ำบริสุทธิ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.5 จุด A ที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศปกติ (30 องศาเซลเซียส และ 105 ปาสคาล) น้ำอยู่ในสถานะของเหลว การทำแห้งโดยทั่วไป (Conventional Drying) จะให้พลังงานความร้อนกับผลิตภัณฑ์จนถึงระดับความร้อนแฝงของการระเหยน้ำ (Latent Heat of Evaporation) น้ำภายในผลิตภัณฑ์ระเหยเปลี่ยนสถานะเป็นไอที่จุด B แต่การทำแห้งแบบเยือกแข็งจะลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จนถึงจุดเยือกแข็ง C หรือจุด D ซึ่งต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้น้ำภายในผลิตภัณฑ์สร้างผลึกเปลี่ยนสถานะของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นลดความดันสุญญากาศลงจนต่ำกว่าจุด E หรือเส้นขอบเขตของการเปลี่ยนสถานะ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งภายในผลิตภัณฑ์เกิดการระเหิดเปลี่ยนสถานะเป็นไอ และในขั้นตอนสุดท้ายจึงค่อยๆ ให้พลังงานความร้อนแฝงของการระเหิด (Latent Heat of Sublimation) ยกระดับอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อให้น้ำแข็งระเหิดเป็นไอได้อย่างสมบูรณแต่ในความเป็นจริงปริมาณความชื้นหรือน้ำที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ไม่ได้อยู่ในรูปของน้ำบริสุทธิ์มักจะอยู่ผสมกับสารอื่นๆ ในรูปของตัวทำละลาย (Solvent) และตัวถูกละลาย (Solute) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของสาร ดังนั้นในการทำแห้งแบบเยือกแข็งกับ

ผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดจึงมีข้อแตกต่าง ข้อจำกัด และมีลักษณะเฉพาะของแต่ละผลิตภัณฑ์ไม่เหมือนกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์นั้นๆ โดยรูปที่ 2.5 จะแสดงจุดต่างๆ ของน้ำ ดังนี้ จุดหลอมเหลว (Melting Point) คือ จุดที่ทำให้น้ำเปลี่ยนจากสถานะของแข็งกลายเป็นของเหลวที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เราสามารถเปลี่ยนน้ำจากสถานะของแข็งเป็นแก๊สโดยไม่ผ่านสถานะของเหลว (จากจุด D เปลี่ยนเป็นจุด E โดยไม่มีการผ่านสถานะที่เป็นของเหลว) ได้จนความดันต่ำกว่า $6x10^{-3}$ บรรยากาศ จุดเดือด (Boiling Point) คือ จุดที่ทำให้น้ำเปลี่ยนจากสถานะของเหลวกลายเป็นแก๊สที่จุดเดือดปกติ (ความดัน 1 บรรยากาศ) น้ำมีจุดเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส จุดร่วมสาม (Triple Point) ของน้ำจะอยู่ที่ความดัน $6x10^{-3}$ บรรยากาศ อุณหภูมิ 0.0098 องศาเซลเซียส และจุดวิกฤต (Critical Point) ของน้ำจะอยู่ที่ความดัน 217.7 บรรยากาศ อุณหภูมิ 374.4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2.2 ค่าคงตัววิกฤตและจุดร่วมสาม

สาร	สูตรเคมี	มวลโมเลกุล (kg/kmol)	ค่าคงตัววิกฤต			จุดร่วมสาม	
			T_c (K)	P_c (MPa)	v_c (m^3/kg)	T_{tp} (K)	P_{tp} (kPa)
แอมโมเนีย	NH_3	17.031	405.5	11.35	0.00426	195.40	6.076
อาร์กอน	Ar	39.948	150.8	4.87	0.00188	83.81	68.9
คาร์บอนไดออกไซด์	CO2	44.01	304.1	7.38	0.00212	216.55	517
คาร์บอนมอนอกไซด์	CO	28.01	132.9	3.50	0.00333	68.10	15.37
ฮีเลียม	He	4.003	5.19	0.227	0.00143	2.19	5.1
ไฮโดรเจน	H_2	2.016	33.2	1.30	0.00323	13.84	7.04
ไนโตรเจน	N_2	28.013	126.2	3.39	0.0032	63.18	12.6
ออกซิเจน	O_2	31.999	154.6	5.04	0.00229	54.36	0.152
ซัลเฟอร์ไดออกไซด์	SO_2	64.063	430.8	7.88	0.00191	197.69	1.67
น้ำ	H_2O	18.015	647.3	22.12	0.00317	273.16	0.61
อาร์-22	$CHClF_2$	86.469	369.3	4.97	0.00191	115.76	-
มีเทน	CH_4	16.043	190.4	4.60	0.00615	90.68	11.7
อาร์-134a	CF_3CH_2F	102.03	374.2	4.06	0.00197	169.85	0.39
อะซิติก	$C_2H_4O_2$	60.052	593	5.78	1.71	289.8	1.27
ไฮโดรคลอริก	HCl	36.461	324.68	8.256	-	161.15	13.8
ไนตริก	N_2	28.0134	126.19	3.0698	-	63.14	12.52

คุณลักษณะของการทำแห้งแบบเยือกแข็งกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีคุณลักษณะที่แตกต่างไปจากการทำแห้งโดยทั่วไป คือ เป็นการทำแห้งภายใต้อุณหภูมิและความดันต่ำ ใช้เวลาการทำแห้งนานเนื่องจากต้องการรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์สดมากที่สุด การ

ทำแห้งแบบเยือกแข็งใช้อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน ในขณะที่การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Dryer) ใช้อุณหภูมิสูงในเวลาสั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่นำมาแปรรูปว่ามีองค์ประกอบทางเคมีสารออกฤทธิ์และคุณค่าอื่นๆ ที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากความร้อนมากน้อยเพียงไรผลิตภัณฑ์มีความจำเป็นและมีการตลาดรองรับเพียงพอ ข้อดี คือ ผลิตภัณฑ์มีความเสียหายต่ำ โครงสร้างผลิตภัณฑ์มีรูพรุนมากส่งผลให้ผลิตภัณฑ์สามารถคืนตัว (Rehydration) ได้อย่างรวดเร็วและข้อจำกัด คือ เครื่องมือมีราคาแพงกว่าการทำแห้งชนิดอื่นประมาณ 3 เท่าตัว มีความสิ้นเปลืองเวลาและพลังงานในการดำเนินการมาก

2.8.1 ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

2.8.1.1 การแช่เยือกแข็ง (Freezing) เป็นการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Freezing Point) เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice Crystal Formation) อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง (Freezing Rate) ควรเป็นการแช่แข็งแบบเร็วเพื่อให้เกิดผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก การแช่เยือกแข็งแบบเร็วที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นเป่า (Air Blast Freezing) การแช่เยือกแข็งแบบไครโอเจน (Cryogenic Freezing) และการแช่เยือกแข็งแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด (Immersion Freezing) เป็นต้น

2.8.1.2 การทำแห้งขั้นต้น (Primary Drying) เป็นขั้นตอนของการลดปริมาณน้ำ (Dehydration) โดยการระเหิดน้ำแข็งให้เป็นไอโดยการลดความดันบรรยากาศเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระดับของสุญญากาศ (Vacuum) ควรอยู่ต่ำกว่า 132 ปาสคาล และ 132 มิลลิปาสคาล ตามลำดับ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งจึงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง (Ice Layer) จะเริ่มจากชั้นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ระเหิดไปเป็นไอทำให้บริเวณนี้กลายเป็นชั้นแห้ง (Dry Layer) จากนั้นเป็นการระเหิดของชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ระเหิดผ่านชั้นแห้งออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาการระเหิดขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

2.8.1.3 การทำแห้งขั้นที่สอง (Secondary Drying) เมื่อการทำแห้งขั้นต้นเสร็จสมบูรณ์น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นหลงเหลืออยู่จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออกถึงระดับความชื้นที่ปลอดภัยสำหรับการเก็บรักษา

บทที่ 3
แนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2002 S. Morimura และคณะ [23] ได้ทำการศึกษาการพัฒนากระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดคอลลาเจนจากปลาและของเสียจากปศุสัตว์ การพัฒนาขั้นตอนในการสกัดโปรตีนและการผลิตเปปไทด์โดยการใช้เอนไซม์ในการสกัดคอลลาเจนจากของเสียที่ได้จากกระดูกและปลา ขั้นแรก คือ การปรับสภาพวัตถุดิบโดยการกำจัดไขมันและสารอนินทรีย์ที่ไม่ใช่คอลลาเจนออก และโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกสกัดภายใต้สภาวะกรด (pH 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังหมูมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 100 กิโลดาลตัน คอลลาเจนที่สกัดได้จะไม่มีกลิ่นและมีความปลอดภัยปลอดภัยเมื่อนำไปใช้งานทางแพทย์ผิวหนังและเป็นที่ยอมรับในการนำไปใช้งานทางด้านเครื่องสำอางค์ คอลลาเจนเป็นสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง (IPOX50, 0.18 and 0.45 mg/ml) มีศักยภาพในการลดความดันโลหิต (IC50, 0.16 and 0.41 mg/ml) และยังสามารถนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้

ในปี ค.ศ. 2003 M. Sadowska และคณะ [2] ได้ทำการศึกษาการแยกคอลลาเจนออกจากผิวหนังของปลาค็อด (Cod) โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกและกรดซิตริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:4 และ 1:6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ การสกัดถูกดำเนินการเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าสกัดที่อัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 85 และเมื่อมีการเพิ่มอัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกมีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดซิตริกมีปริมาณคงที่ไม่เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนที่ใช้สกัด

ในปี ค.ศ. 2007 E. Skierka and M. Sadowska [24] ได้ทำการศึกษาผลความแตกต่างของกรดและเอนไซม์เพปซินในการสกัดคอลลาเจนจากปลาค็อดโดยใช้สารละลายกรดซิตริก แลคติก และอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ดำเนินการสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในอัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากการศึกษาพบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากกรดอะซิติกและกรดแลคติกให้ผลได้สูงสุดร้อยละ 90 คอลลาเจนที่สกัดได้จากรดซิตริกให้ผลได้ร้อยละ 60 และคอลลาเจนที่สกัดได้จากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ร้อยละ 18 หลังจากนั้นทำการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์เพปซินร่วมกับกรดผลที่ได้ คือ การสกัดคอลลาเจนจากโซเดียมคลอไรด์และกรดซิตริก ได้ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยกรดเพียงอย่างเดียว ร้อยละ 40 และร้อยละ 20 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์คอลลาเจนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส

(Electrophoresis) พบว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติกและกรดแลคติกจะให้คอลลาเจนที่มีโครงสร้างโมเลกุลครบ 3 สาย (Triple Helix) ส่วนคอลลาเจนที่สกัดจากเอนไซม์เพปซินร่วมกับโซเดียมคลอไรด์และกรดซิตริกทำให้โครงสร้างโมเลกุล 3 สาย ของคอลลาเจนถูกทำลายหรือผิดรูปไปจากเดิม

ในปี ค.ศ. 2008 M. Yan และคณะ [25] ได้ทำการศึกษาลักษณะคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังปลาวอล์อายพอลลอค (Walleye Pollock) ด้วยกรด ลักษณะที่โดดเด่นของคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังปลาวอล์อายพอลลอค (Walleye Pollock) คือ สามารถดูดกลืนแสงได้ 220-280 นาโนเมตร การวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย SDS-PAGE พบว่าเป็นคอลลาเจน Type I นอกจากนี้การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนด้วย FT-IR พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ยังคงมีลักษณะเป็น Triple Helix อุณหภูมิการเสื่อมสภาพ (T_d) และอุณหภูมิการหดตัว (T_s) ของคอลลาเจน คือ 24.6 และ 47 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างไรก็ตามจากรายงานการสกัดคอลลาเจนที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิการเสื่อมสภาพ (T_d) ของคอลลาเจนจากผิวหนังปลาวอล์อายพอลลอค (Walleye Pollock) มีค่าสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากผิวหนังปลาค็อด (Cod) จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าผิวหนังปลาวอล์อายพอลลอค (Walleye Pollock) เป็นแหล่งที่มีศักยภาพในการสกัดคอลลาเจนและใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางทฤษฎีสำหรับการวิจัยได้ดีกว่าปลาชนิดอื่น

ในปี ค.ศ. 2008 I. Bae และคณะ [4] ได้ทำการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกจากผิวหนังของปลาพบว่าปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลาสลิดดำ ปลาสลิดทะเล ปลากระเบนนก ปลากระเบนแดง และปลากระเบนยันไต คอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 3.9, 3,4, 5.3, 5.7 และ 5.5 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ คอลลาเจนที่สกัดได้จัดเป็นคอลลาเจนชนิด Type I ซึ่งประกอบด้วยสาย $\alpha 1$ 2 สาย และสาย $\alpha 2$ 1 สาย โดยคอลลาเจนของสายพันธุ์ปลากระเบนจะมีการเสียสภาพที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่ากระดูกของปลาสลิดดำและปลาสลิดทะเล ค่าที่ทำให้คอลลาเจนเกิดการตกตะกอนอยู่ในช่วง pH 2-4

ในปี ค.ศ. 2009 F.Y. Cheng และคณะ [26] ได้ศึกษาผลความแตกต่างของการสกัดคอลลาเจนที่มีสารเมลานินจากหนังเท้าไก่ด้วยเอนไซม์ร่วมกับกรด 4 ชนิด คือ กรดอะซิติก กรดซิตริก กรดไฮโดรคลอริก และกรดแลคติก โดยทำการวิเคราะห์สารสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis) และ UV-Vis (200-400 นาโนเมตร) ซึ่งในการวิเคราะห์องค์ประกอบของคอลลาเจนที่สกัดได้พบว่ามีปริมาณเมลานินปะปนอยู่ด้วย จากผลการวิเคราะห์สรุปว่ากรดอะซิติกให้ผลสูงสุด คือ ในปริมาณคอลลาเจน 516.6 มิลลิกรัม/กรัม จะมีปริมาณเมลานินร้อยละ 7.3

ในปี ค.ศ. 2009 X.R. Su และคณะ [29] ได้ทำการศึกษาลักษณะของคอลลาเจนที่ละลายในกรดอะซิติกจากผนังเยื่อบุของหนอนทะเลพบว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละลายกรดอะซิติก

ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 45.6 คอลลาเจนประกอบด้วยสาย α_1, α_2 และ β อุณหภูมิหลอมเหลวอยู่ที่ 54.5 องศาเซลเซียส มีปริมาณของโพลีนและไฮดรอกซีโพลีนต่ำกว่าคอลลาเจนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่มีค่าสูงกว่าปลาชนิดอื่นๆ

ในปี ค.ศ. 2009 S.K. Zeng และคณะ [3] ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของคอลลาเจนจากผิวหนังของปลานิลโดยใช้กรดอะซิติกพบว่าปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 39.4 ของน้ำหนักแห้ง จากการวิเคราะห์มีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีนประมาณร้อยละ 35.6 ส่วนโพลีนและไฮดรอกซีโพลีนพบในปริมาณ 210/1000 อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจน คือ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลากระพงแดง คอลลาเจนที่พบเป็นคอลลาเจนประเภท Type I

ในปี ค.ศ. 2010 M. Ahmad และคณะ [27] ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบและลักษณะทางกายภาพของคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังปลาวัวหางตัดด้วยกรดโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ได้ปริมาณคอลลาเจนสกัดร้อยละ 4.19 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบคอลลาเจนด้วยวิธี FTIR พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดยังคงมีโครงสร้างคอลลาเจนครบ 3 สาย มีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีนมากที่สุด ส่วนโพลีนและไฮดรอกซีโพลีนพบในปริมาณน้อย จากการวิเคราะห์ทางความร้อนที่พบว่าคอลลาเจนเสียสภาพในกรดอะซิติก 0.05 โมลาร์ และน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 27.7 และ 35.8 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่าความหนืดของสารละลายลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 4 องศาเซลเซียส ถึง 52 องศาเซลเซียส ค่า Isoelectric Point ที่ทำให้ประจุสุทธิของคอลลาเจนเป็นศูนย์หรือค่าที่ทำให้คอลลาเจนตกตะกอนอยู่ในช่วง pH 5.58-5.68

ในปี ค.ศ. 2010 T. Nagai และคณะ [28] ได้ทำการศึกษาลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดจากผิวของปลาสเมลท์โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากการทำแห้งมีปริมาณสูงสุดร้อยละ 24 จากการวิเคราะห์สมบัติของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนมีองค์ประกอบของโปรตีนครบ 3 สาย ซึ่งประกอบด้วย α_1, α_2 และ α_3 อุณหภูมิเสียสภาพของคอลลาเจน 32.5 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังหมูประมาณ 4.5 องศาเซลเซียส ส่วนการวิเคราะห์ด้วย FT-IR พบว่าโครงสร้างทุติยภูมิของคอลลาเจนประกอบไปด้วย α-helix ร้อยละ 11 β-sheet ร้อยละ 34 β-turn ร้อยละ 19 และชนิดอื่นๆ อีกร้อยละ 21 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดจากผิวหนังของปลาสเมลท์จะทำให้คอลลาเจนมีโครงสร้างครบ 3 สาย เมื่อเปรียบเทียบกับคอลลาเจนที่สกัดได้จากผิวของหนังหมู

ในปี ค.ศ. 2012 S. Zung และคณะ [5] ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและลักษณะของคอลลาเจนจากผิวหนังของปลาช่อนทะเลโดยใช้กรดอะซิติกและเอนไซม์เพปซินในการสกัดคอลลาเจนพบว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละสายกรดอะซิติกมีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 35.5 และการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์มีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 12.3 คอลลาเจนที่พบเป็นคอลลาเจนประเภท Type I ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างโมเลกุลครบ 3 สาย จากการวิเคราะห์ทางความร้อนพบว่าคอลลาเจนเสียสภาพในกรดอะซิติกและเอนไซม์เพปซินที่อุณหภูมิ 34.62 และ 33.97 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติกให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มากกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์เพปซิน

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 วัตถุดิบและสารเคมี

4.1.1 กรดอะซิติกความเข้มข้น 99.8 % ยี่ห้อ QRëC Grade AR

4.1.2 กรดไนตริกความเข้มข้น 70% ยี่ห้อ ANALYTICAL UNIVER REAGENT

4.1.3 กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 37% ยี่ห้อ RCI Labscan Limited Grade AR

4.1.4 อะซิโตนยี่ห้อ RCI Labscan Limited Grade AR

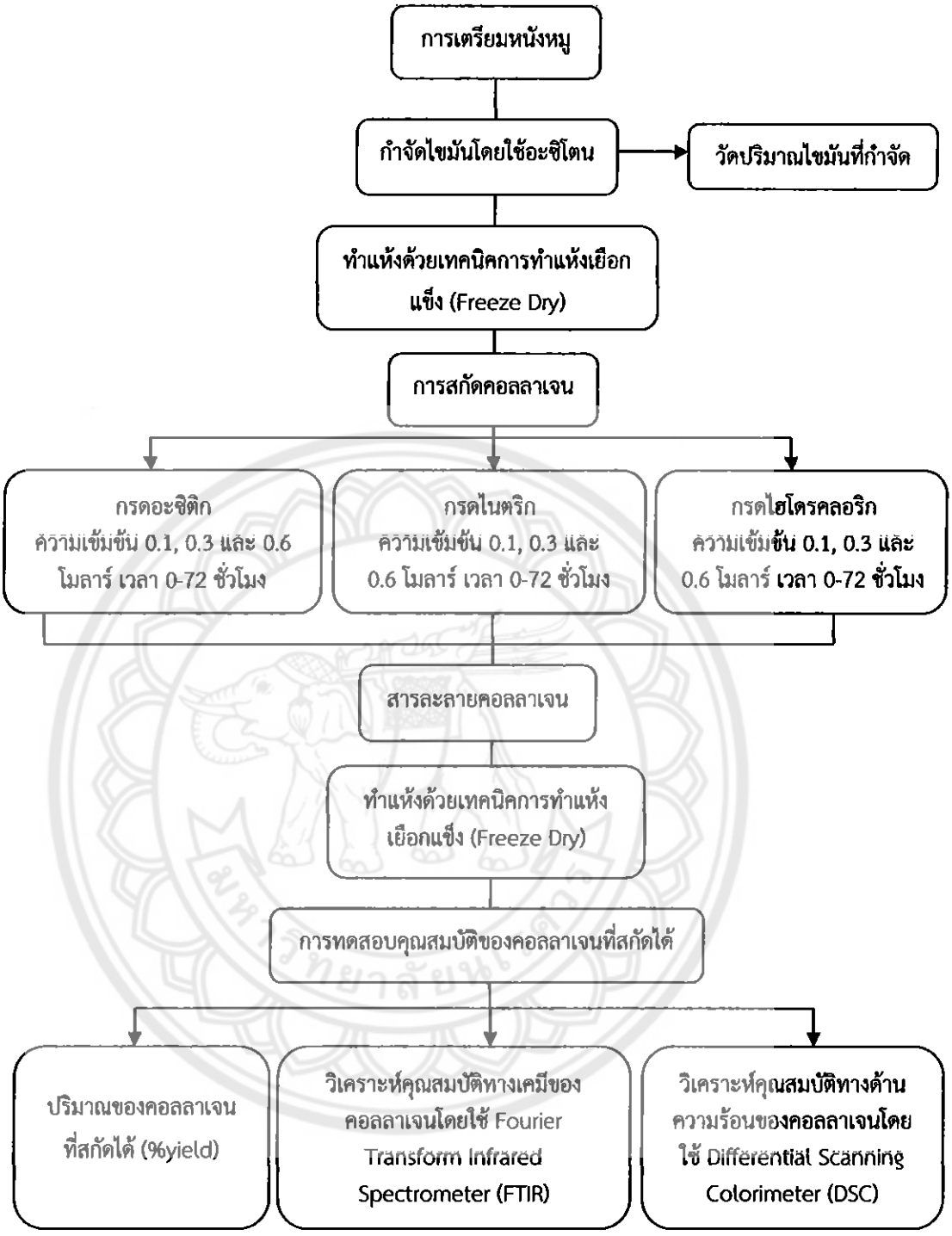
4.1.5 หนังหมูแห้ง (Dried porcine skin) ช่วงอายุ 3-6 เดือน

4.1.6 Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

4.1.7 Differential Scanning Colorimeter (DSC)

4.1.8 เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) ยี่ห้อ LABCONCO รุ่น FreeZone® 2.5 Liter Freeze Dry System

4.1.9 เครื่องปั่นกวน ยี่ห้อ IKA รุ่น RW20 Digital



รูปที่ 4.1 กระบวนการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมู

4.2 วิธีการทดลอง

ในการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูมีขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจนดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการสกัด ดังนี้

4.2.1 การเตรียมหนังหมู

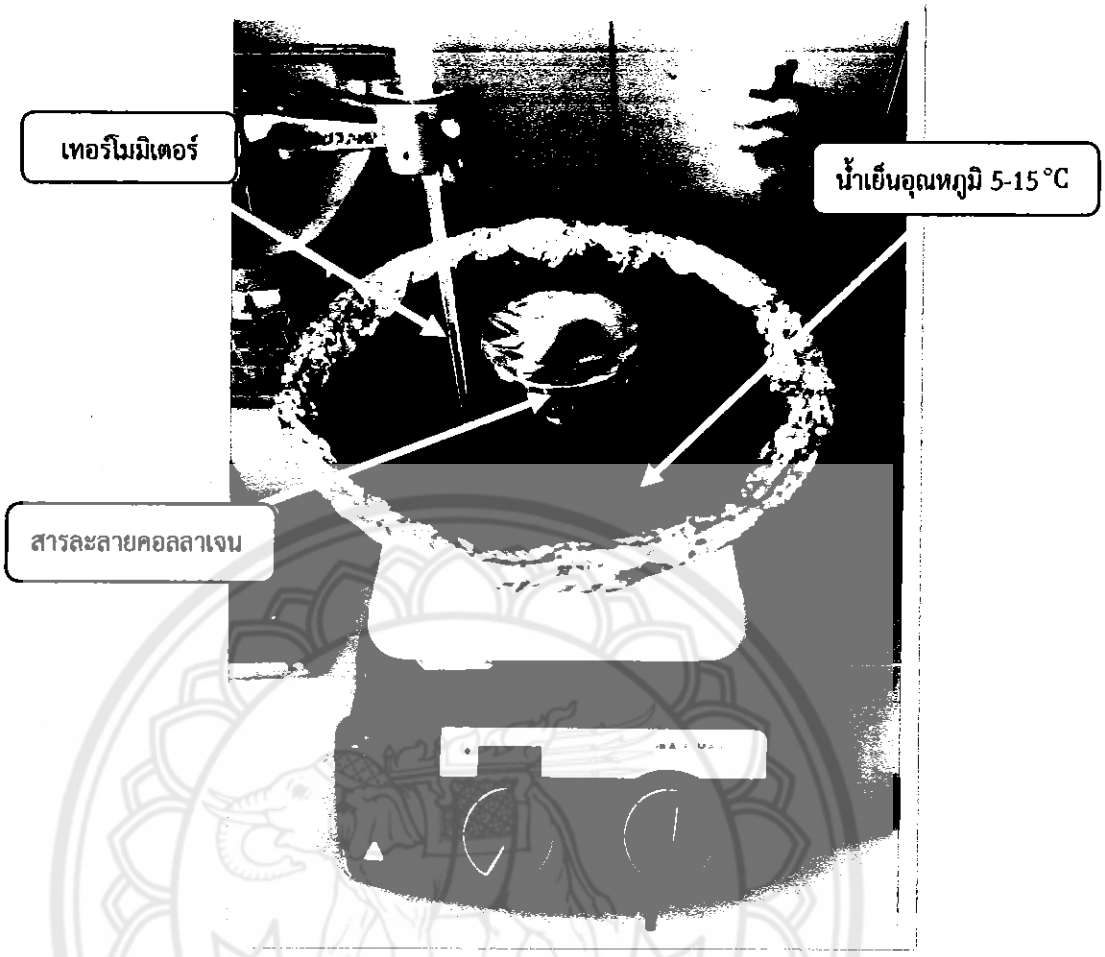
4.2.1.1 ขั้นตอนการเตรียมหนังหมู นำหนังหมูที่ผ่านการกำจัดขนและไขมันเบื้องต้นมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำหนังหมูไปบดด้วยเครื่องบดหมูให้ละเอียดจนกระทั่งได้หนังหมูขนาดความกว้างช่วง 5-8 มิลลิเมตร และความยาวช่วง 3-5 มิลลิเมตร โดยทำการวัดจากหนังหมู 20 ตัวอย่าง นำหนังหมูที่เตรียมไว้ใส่ในภาชนะแล้วนำไปเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิประมาณ -47 องศาเซลเซียส

4.2.1.2 **กระบวนการกำจัดไขมัน** นำหนังหมูสดที่เตรียมได้แช่ในสารละลายอะซิโตนและทำการปั่นกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างด้วยน้ำสะอาดจากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ –47 องศาเซลเซียส [30]

$$\%\text{ไขมันที่กำจัดได้} = \frac{\text{น้ำหนักหนังหมูแห้งเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักหนังหมูแห้งสุดท้าย}}{\text{น้ำหนักหนังหมูแห้งเริ่มต้น}} \times 100 \qquad (4.1)$$

4.2.1.3 **การทำแห้งหนังหมูแบบสุญญากาศ** นำหนังหมูที่ผ่านการกำจัดไขมันแล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -47 องศาเซลเซียส และทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.2 หนังหมูแห้งที่ผ่านการทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry)



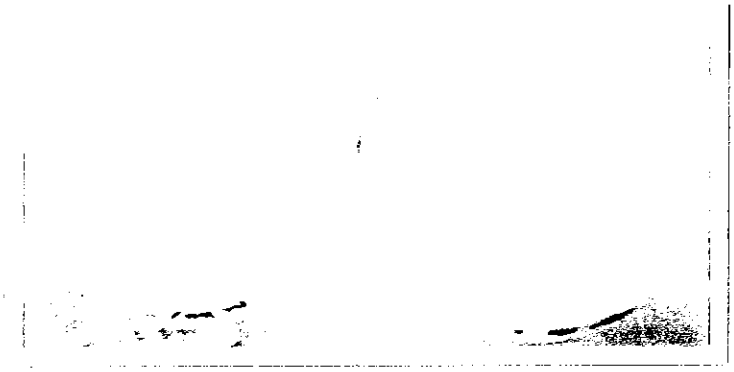
รูปที่ 4.3 แสดงวิธีการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูแห้งด้วยกรด

4.3 กระบวนการการสกัดคอลลาเจน

รูปที่ 4.3 แสดงวิธีการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูแห้งด้วยกรดโดยมีขั้นตอนในการสกัด ดังนี้

4.3.1 การสกัดด้วยกรด

นำหนังหมูที่ผ่านการกำจัดไขมันและทำแห้งแล้วมาสกัดคอลลาเจนด้วยกรดโดยใช้อัตราส่วนหนังหมูต่อกรด 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นนำไปปั่นกวนด้วยเครื่องกวนผสมที่อุณหภูมิช่วง 5-15 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำเย็นในการควบคุมอุณหภูมิ ตัวแปรที่ทำการศึกษาในการสกัด ได้แก่ ชนิดของกรด คือ กรดอะซิติก กรดไนตริก และกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นของกรด 0.1, 0.3 และ 0.6 โมลาร์ เวลาการสกัด 1, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำสารละลายคอลลาเจนที่สกัดได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปทำแห้งต่อไป



รูปที่ 4.4 สารละลายคอลลาเจน

4.3.2 ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dry)

นำสารละลายคอลลาเจนที่สกัดได้ดังแสดงในรูปที่ 4.4 โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -47 องศาเซลเซียส และความดัน 0.160 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้คอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้งดังแสดงในรูปที่ 4.5

รูปที่ 4.5 คอลลาเจนแห้ง (Dried Collagen)

4.4 การวิเคราะห์ผล

4.4.1 การคำนวณหาร้อยละของคอลลาเจนที่สกัดได้

ในการคำนวณร้อยละของคอลลาเจนที่สกัดได้สามารถคำนวณได้แสดงในสมการที่ (4.2)

$$\%yield = \frac{W_2}{W_1} \times 100 \qquad (4.2)$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักหนังหมูแห้ง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักคอลลาเจนแห้ง (กรัม)

4.4.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจน

ในการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้สามารถวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) นำคอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้งน้ำหนักประมาณ 3 มิลลิกรัม และผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ประมาณ 100 มิลลิกรัม แล้วนำไปอัดขึ้นรูปให้เป็นแผ่นบางโดยวิเคราะห์ภายใต้คลื่นอินฟราเรดช่วง 4000 ถึง 500 ซม$^{-1}$ อัตราการเก็บข้อมูล 4 ซม$^{-1}$ ต่อจุด จำนวนสแกน 128 สแกน [30]

4.4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อน

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนโดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) นำคอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้งประมาณ 6 มิลลิกรัม ใส่ลงในถาดอะลูมิเนียม (Aluminum Pan) แล้วนำไปทดสอบด้วยเครื่อง DSC อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จำนวนสแกน 128 สแกน โดยจะทำการศึกษาในช่วงอุณหภูมิ 25-300 องศาเซลเซียส

บทที่ 5

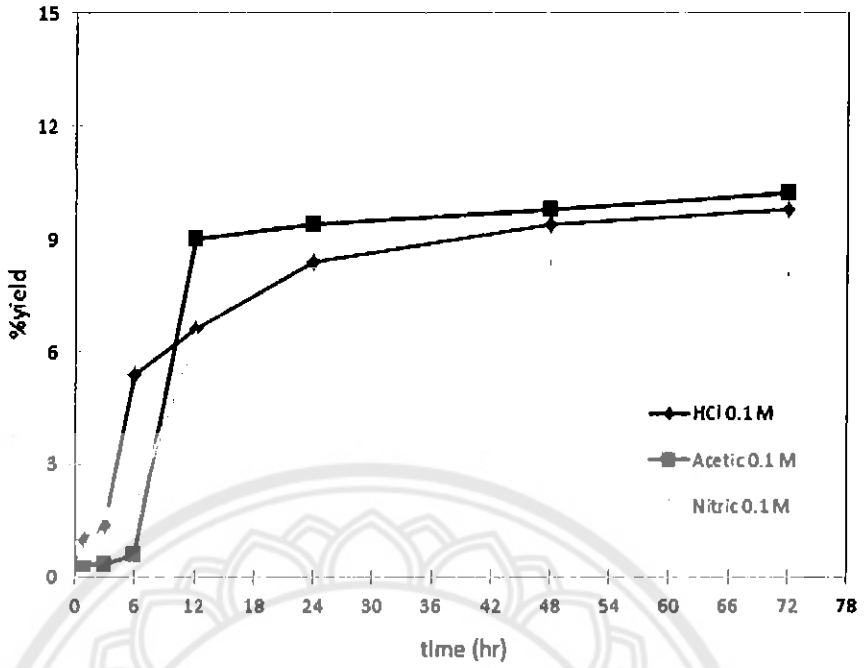
ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผล

5.1 ผลของสภาวะการสกัดที่มีต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้

5.1.1 ผลของเวลาและชนิดกรดที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน

รูปที่ 5.1 แสดงผลของเวลาและชนิดของกรด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริกที่มีผลต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้และเวลาที่ใช้ในการสกัดในช่วง 0-72 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดถูกควบคุมที่ 0.1 โมลาร์ และ 5-15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติกที่การสกัด 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 0.75 เมื่อเพิ่มเวลาการสกัดคอลลาเจนเป็น 12 ชั่วโมง ปริมาณของคอลลาเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นร้อยละ 9 สำหรับการสกัดโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่การสกัด 6 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 5.25 เมื่อเพิ่มเวลาสกัดเป็น 12 ชั่วโมง ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 6.75 การสกัดโดยใช้กรดไนตริกหลังจากผ่านไป 6 ชั่วโมง ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 1.5 และเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดเป็น 12 ชั่วโมง ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นร้อยละ 6.25 แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มเวลาในการสกัดเป็น 72 ชั่วโมง ของกรดทุกชนิดพบว่าไม่ส่งผลต่อปริมาณสูงสุดของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยที่ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริกได้สูงสุด คือ ร้อยละ 10, 9.52 และ 7.8 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงเวลาที่ใช้ในการสกัดโดยใช้กรดทั้ง 3 ชนิด พบว่าปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จะเข้าสู่สภาวะสมดุลเมื่อเวลาการสกัด 24 ชั่วโมง ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการสกัดที่เหมาะสม คือ 24 ชั่วโมง

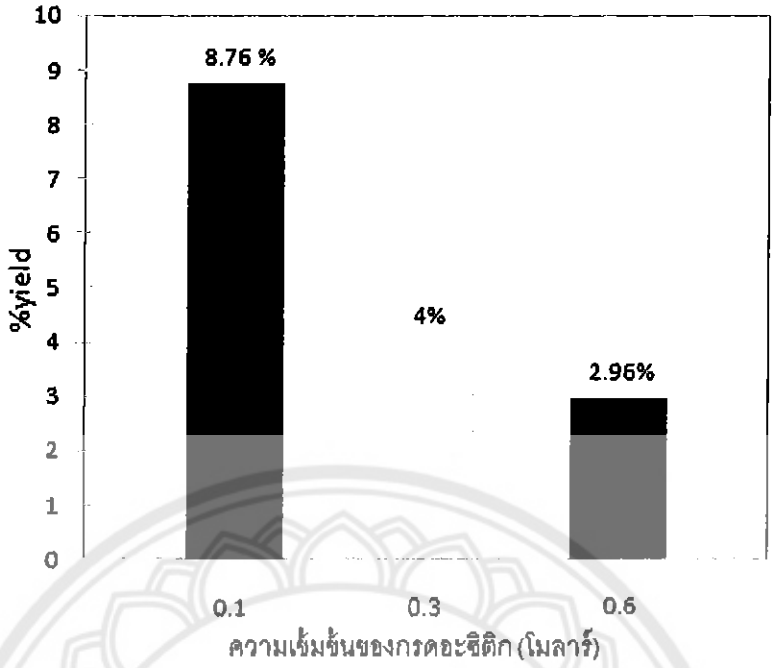
เมื่อพิจารณาผลของชนิดของกรดที่มีต่อปริมาณคอลลาเจนพบว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติกให้ปริมาณคอลลาเจนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดไนตริก เนื่องจากกรดอะซิติกเป็นกรดอ่อนมีฤทธิ์ในการกัดกร่อนต่ำกว่ากรดไฮโดรคลอริกและกรดไนตริก ซึ่งจะส่งผลต่อขนาดของสายโมเลกุลของคอลลาเจน ในกรณีการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดที่มีฤทธิ์กัดกร่อนสูง เช่น กรดไฮโดรคลอริก ความแรงของกรดจะทำลายโมเลกุลส่งผลทำให้คอลลาเจนที่ได้มีความยาวของสายโซ่สั้นลงและทำให้คอลลาเจนไม่สามารถจัดเรียงตัวของเส้นใยให้มีความหนาแน่นสูงจึงส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่ได้จะมีค่าลดลง



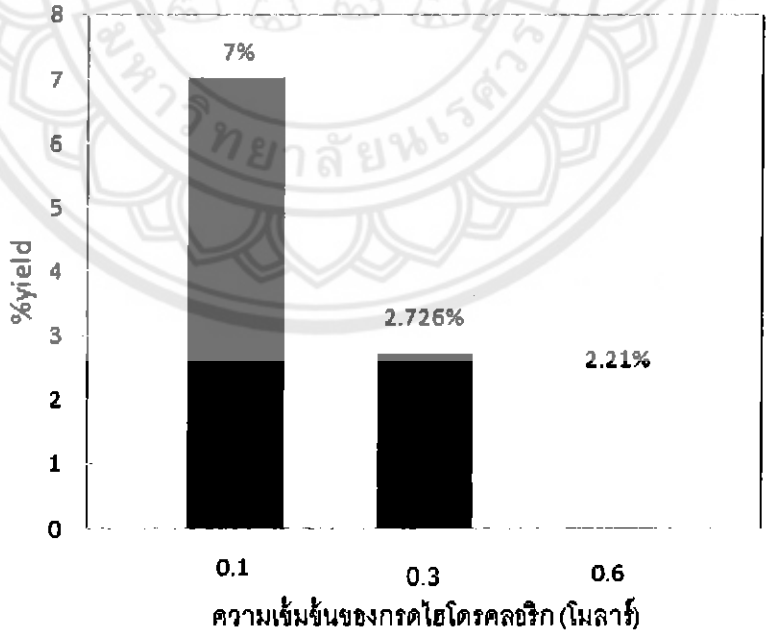
รูปที่ 5.1 แสดงผลของชนิดของกรดและเวลาที่ใช้ในการสกัด

5.1.2 ผลของความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน

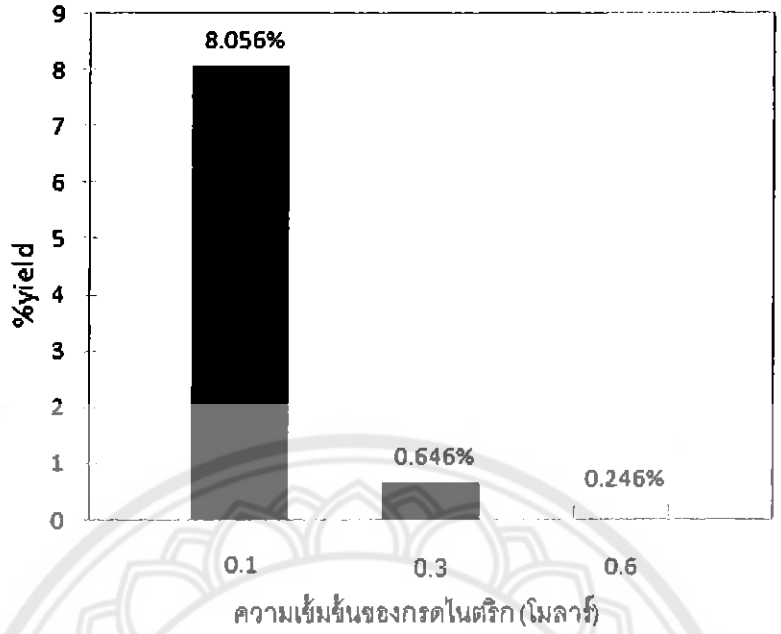
รูปที่ 5.2 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่มีต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการสกัดอยู่ในช่วง 0.1-0.6 โมลาร์ เวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดได้ควบคุมที่ 24 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 5-15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จะได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 8.76 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดเป็น 0.3 และ 0.6 โมลาร์ พบว่าปริมาณของคอลลาเจนลดลงเป็นร้อยละ 4 และร้อยละ 2.96 ตามลำดับ รูปที่ 5.3 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกพบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 7 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเป็น 0.3 และ 0.6 โมลาร์ ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ลดลงเป็นร้อยละ 2.726 และร้อยละ 2.21 ตามลำดับ รูปที่ 5.4 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไนตริก ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ร้อยละ 8.056 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเป็น 0.3 และ 0.6 โมลาร์ ปริมาณคอลลาเจนลดลงเหลือร้อยละ 0.646 และ 0.246 ตามลำดับ และการสกัดโดยใช้กรดทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูงสุดร้อยละ 8.76, 7 และ 8.056 ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดในการสกัดคอลลาเจนจะส่งผลให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ลดลง เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นในการสกัดของกรดทั้ง 3 ชนิดจะส่งผลทำให้เกิดการทำลายสายโมเลกุลมากขึ้นซึ่งทำให้สายโมเลกุลคอลลาเจนมีสายที่สั้นมากทำให้ไม่สามารถยึดเกาะเป็นเส้นใยคอลลาเจนได้



รูปที่ 5.2 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่มีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เวลาในการสกัดที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 5.3 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่มีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เวลาในการสกัดที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 5.4 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไนตริกที่มีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เวลาในการสกัดที่ 24 ชั่วโมง

5.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจน

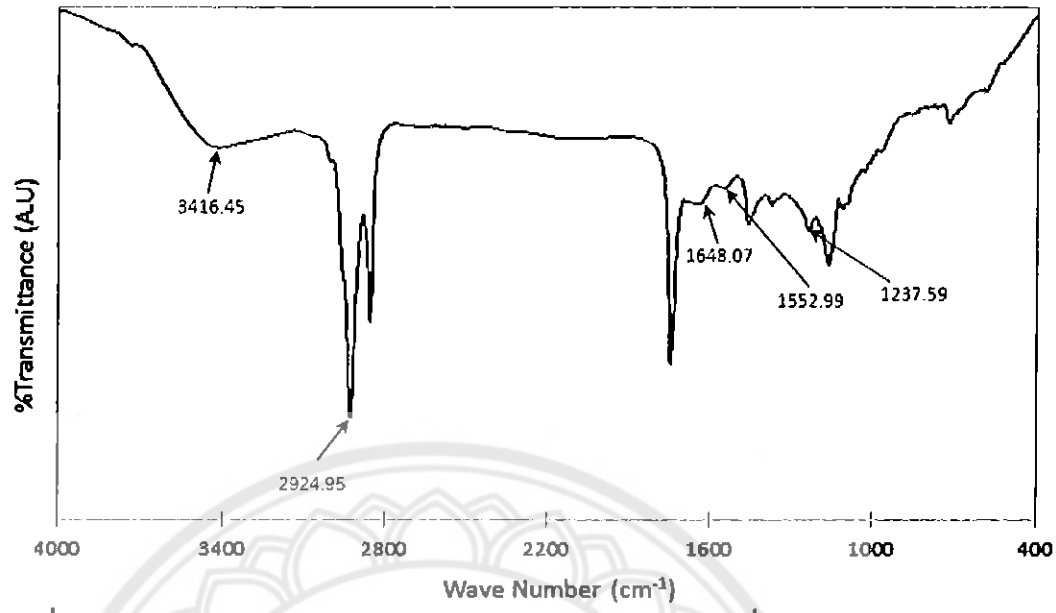
5.2.1 ลักษณะ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน (Type I Collagen)

ในการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้สามารถวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) โดยอ้างอิงข้อมูล FT-IR ของคอลลาเจนมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ ข.1 และตารางที่ ก.8 การดูดกลืนที่ช่วงคลื่น 3289 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลของสารประกอบ Amide A ซึ่งเป็นกลุ่มของ N-H Stretching ซึ่งเกี่ยวข้องกับพันธะไฮโดรเจน การดูดกลืนที่ช่วงคลื่น 2920 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลของสารประกอบ Amide B ซึ่งเป็น Asymmetrical Stretch ของ CH_2 การดูดกลืนที่ช่วงคลื่น 1644 ซม$^{-1}$ แสดงถึงการสั่นของโมเลกุลของสารประกอบ Amide I ซึ่งเป็นกลุ่มของ C=O stretching ที่เกี่ยวของกับโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน การดูดกลืนช่วงคลื่นระหว่าง 1537 ซม$^{-1}$ (Amide II) N-H Bending และการดูดกลืนช่วงคลื่นที่ 1260 ซม$^{-1}$ (Amide III) แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างที่ขดเป็นเกลียวของคอลลาเจน [31]

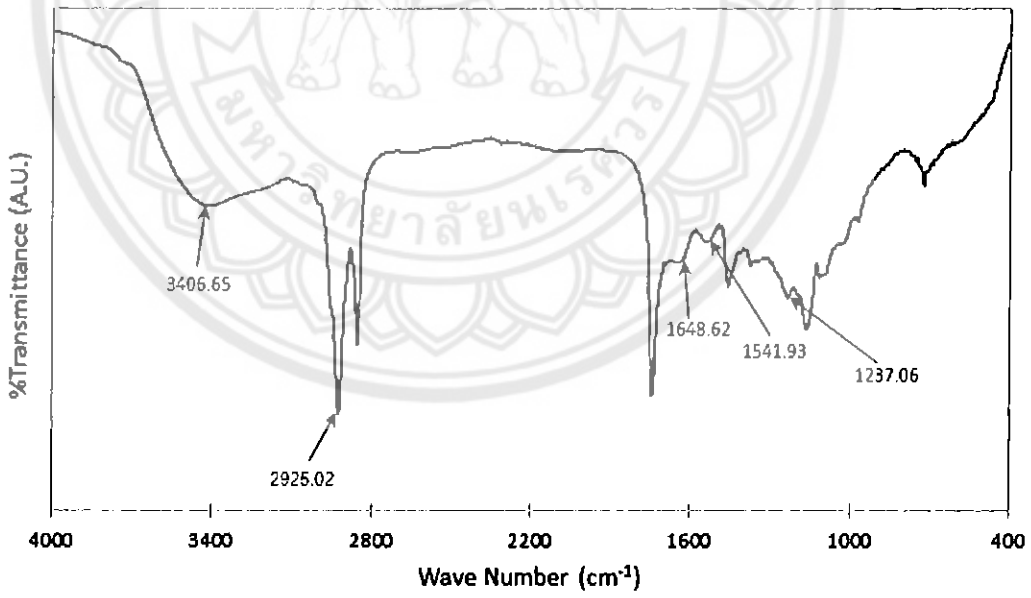
5.2.2 ลักษณะ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้

รูปที่ 5.5 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังหมูโดยใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่าของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในตำแหน่งพีคที่ช่วงคลื่น 3216 ซม$^{-1}$ แสดงถึงสารประกอบ Amide A พีคที่ช่วงคลื่น 2924 ซม$^{-1}$ แสดงถึงสารประกอบ Amide B พีคที่ช่วงคลื่น 1648 ซม$^{-1}$ แสดงถึงสารประกอบ Amide I และพีคที่ช่วงคลื่น 1552 ซม$^{-1}$แสดงถึงสารประกอบ Amide II รูปที่ 5.6 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พบว่าสเปกตรัมของการดูดกลืนจะแสดงในตำแหน่งพีคที่ช่วงคลื่น 3406 ซม$^{-1}$ (Amide A) พีคที่ช่วงคลื่น 2925 ซม$^{-1}$ (Amide B) พีคที่ช่วงคลื่น 1648 ซม$^{-1}$ (Amide I) และพีคที่ช่วงคลื่น 1541 ซม$^{-1}$ (Amide II) ตามลำดับ รูปที่ 5.7 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้กรดไนตริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พบว่าสเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นแสงจะแสดงในตำแหน่งพีคที่ช่วงคลื่น 3423 ซม$^{-1}$ (Amide A) พีคที่ช่วงคลื่น 2927 ซม$^{-1}$ (Amide B) พีคที่ช่วงคลื่น 1648 ซม$^{-1}$ (Amide I) และพีคที่ช่วงคลื่น 1540 ซม$^{-1}$ (Amide II) จากผลการวิเคราะห์สเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดทั้ง 3 ชนิด พบว่าคอลลาเจนที่ได้แสดงตำแหน่งพีคของการดูดกลืนคลื่นแสงใกล้เคียงกับคอลลาเจนมาตรฐาน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ไม่ส่งผลต่อโครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจน

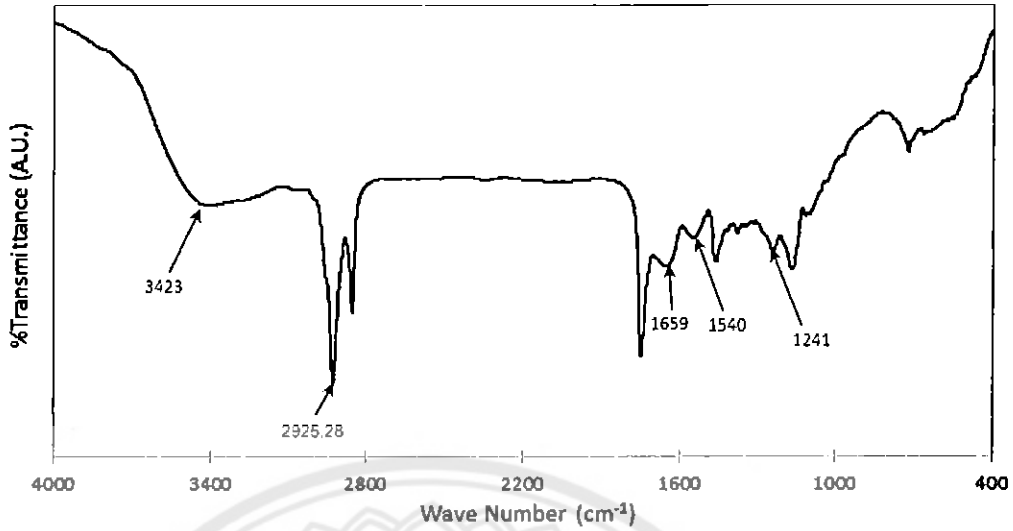
นอกจากกราฟ FT-IR จะแสดงหมู่ฟังก์ชันของคอลลาเจนที่สกัดได้แล้ว ยังสามารถแสดงหมู่ฟังก์ชันของสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัดคอลลาเจน จากผลการวิเคราะห์ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยกรดอะซิติกแสดงหมู่ฟังก์ชันของกรดในตำแหน่งพีคที่เลขคลื่น 3112, 2924, 1412 และ 1295 ซม$^{-1}$ กรดไฮโดรคลอริกแสดงหมู่ฟังก์ชันของกรดในตำแหน่งพีคที่ช่วงคลื่น 2854.27 ซม$^{-1}$ และกรดไนตริกแสดงหมู่ฟังก์ชันของกรดในตำแหน่งพีคที่ช่วงคลื่น 3400.78-1546.37 ซม$^{-1}$ จากกราฟ FT-IR ของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยกรดทั้ง 3 ยังแสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของอะซิโตนในตำแหน่งพีคที่ช่วงคลื่น 1746.78, 1746.83 และ 1745.28 ซม$^{-1}$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับหมู่ฟังก์ชันมาตรฐานพบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของกรดอะซิติก (รูปที่ ข.2) กรดไฮโดรคลอริก (รูปที่ ข.3) กรดไนตริก (ตารางที่ ก.9) และอะซิโตน (รูปที่ ข.4) ตามลำดับ ซึ่งสรุปได้ว่าจะเห็นพีคของสารเคมีที่ใช้เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนที่สกัดได้มีสารเคมีตกค้างที่เกิดจากการใช้กรดในการสกัด



รูปที่ 5.5 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR Spectrum ของคอลลาเจนที่สกัดได้จาก**หนังหมูโดยใช้**กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์



รูปที่ 5.6 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR Spectrum ของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังหมูโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

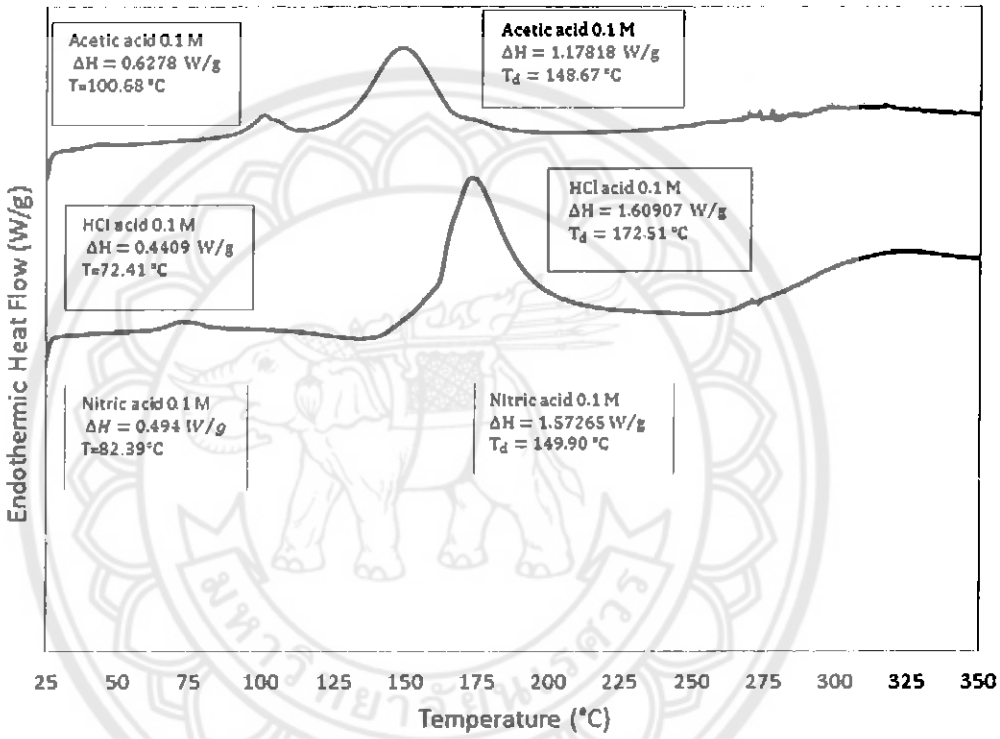


รูปที่ 5.7 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR Spectrum ของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังหมูโดยใช้กรดไนตริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

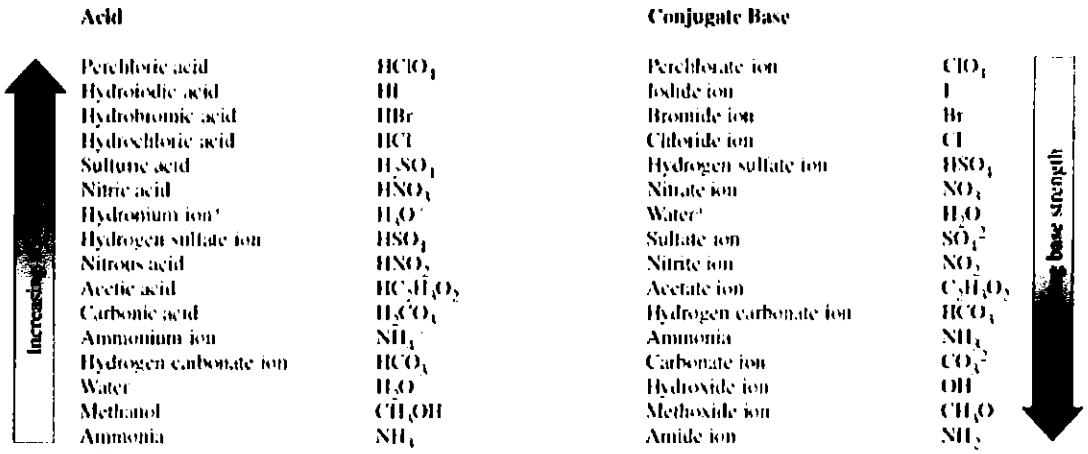
5.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อน

รูปที่ 5.8 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด 3 ชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) จากผลการวิเคราะห์พบว่าอุณหภูมิการเสียสภาพ (T_d) เป็น 148.7, 172.51 และ 149.9 องศาเซลเซียส ในส่วนอุณหภูมิพีคที่ช่วงคลื่นเป็น 100.7, 72.4 และ 82.3 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นพีคที่อาจจะเกิดจากกรดอะซิติก (จุดเดือด 118.1 องศาเซลเซียส) กรดไฮโดรคลอริก (จุดเดือด 110 องศาเซลเซียส) และกรดไนตริก (จุดเดือด 83 องศาเซลเซียส) ที่ตกค้างภายในคอลลาเจนที่สกัดได้ เมื่อพิจารณาชนิดของกรดพบว่าคุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกสามารถทนต่ออุณหภูมิในการเสียสภาพสูงสุด ในส่วนของค่าพลังงานในการดูดความร้อน (Endothermic Heat Flow) ของคอลลาเจนจากกราฟจะเห็นได้ว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกจะมีค่าพลังงานในการดูดความร้อนสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดไนตริกและกรดอะซิติก ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลของชนิดของกรดพบว่าคุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดด้วยไฮโดรคลอริกสามารถทนต่ออุณหภูมิในการเสียสภาพสูงสุด เนื่องจากคอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดไฮโดรคลอริกสามารถชักนำให้เกิดการเชื่อมขวางของเส้นใยได้มากกว่ากรดไนตริกและกรดอะซิติก เนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกสามารถเข้าไปตัดสายโมเลกุลของคอลลาเจนให้มีขนาดเล็กกว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดไนตริกและกรดอะซิติก คอลลาเจนที่มีความหนาแน่นโมเลกุลจำนวนมากเมื่อเกิดการเชื่อมขวางกันระหว่างโมเลกุลจะทำให้เส้นใยของคอลลาเจนมีการจัดเรียงตัวหนาแน่นกว่ากรดชนิดอื่น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับค่าความแรงของกรดแต่ละชนิด จากรูปที่ 5.9 จะแสดงถึงค่าความแรงกรด-เบสของเบรินสเตด-ลาวรี (Bronsted-Lowry)

ของกรดแต่ละชนิด ซึ่งจะเห็นได้ว่ากรดไฮโดรคลอริกมีความแรงของกรดมากกว่ากรดไนตริกและกรดอะซิติก ค่าความแรงของกรดที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ความหนาแน่นของโมเลกุลที่เกิดจากการตัดสายโมเลกุลของคอลลาเจนเพิ่มขึ้น ความสามารถในการชักนำให้เกิดการเชื่อมขวางของเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มขึ้นส่งผลต่อสมบัติทางด้านความร้อนและค่าพลังงานที่ใช้ในการสลายพันธะของคอลลาเจนมีค่าเพิ่มขึ้นจึงทำให้พีคของค่าพลังงานในการดูดความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดไฮโดรคลอริกสูงกว่าของคอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดไนตริกและกรดอะซิติก ตามลำดับ [36, 37]



รูปที่ 5.8 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC)



* The hydronium ion–water combination refers to the ease with which a proton is passed from one water molecule to another, that is, $H_3O^+ + H_2O \rightleftharpoons H_2O + H_3O^+$

รูปที่ 5.9 แสดงลำดับความแรงของกรดและเบสตัวอย่างตามทฤษฎีของเบรินสเตด-ลาวรี [38]

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยวิธีการสกัดด้วยกรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ที่อุณหภูมิช่วง 5-15 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการสกัด 0-72 ชั่วโมง อัตราส่วนหนังหมูแห้งต่อสารละลายกรด 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.6 โมลาร์ ตามลำดับ พบว่าคอลลาเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มเวลาในการสกัด การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติก ไฮโดรคลอริก และไนตริก ทำให้ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้มีปริมาณลดลง การสกัดด้วยกรดอะซิติกให้ปริมาณคอลลาเจนสูงสุดและกรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก ตามลำดับ การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก จะมีอุณหภูมิการเสียสภาพ (T_d) ที่ 148.7, 172.51 และ 149.9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กรดไฮโดรคลอริกส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้ทำให้สามารถทนต่ออุณหภูมิในการเสียสภาพสูงสุด

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดคอลลาเจนมีด้วยกันหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเสียสภาพของคอลลาเจนจะต้องใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส ขนาดของหนังหมูที่ใช้ในการสกัดส่งผลต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้เนื่องจากขนาดที่ลดลงของหนังหมูจะเพิ่มพื้นที่ในการทำให้สารละลายสัมผัสกับคอลลาเจนในหนังหมูได้มากขึ้น ช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนในการสกัดเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มความเข้มข้นของกรดจะส่งผลทำให้ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ลดลง และชนิดของกรดจะส่งผลต่อคุณสมบัติในด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้ขึ้นอยู่กับความแรงของกรดแต่ละชนิด

6.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษานี้คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังหมูได้ถูกนำไปวิเคราะห์เฉพาะสมบัติทางเคมีและคุณสมบัติทางด้านความร้อนเท่านั้น ซึ่งทำให้ไม่สามารถยืนยันได้ว่าคอลลาเจนที่ได้ยังคงสมบัติในด้านอื่นที่มีความจำเป็นต่อการนำไปใช้งาน อาทิสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ผู้ดำเนินโครงงานมีข้อเสนอแนะ ดังนี้

6.2.1 ให้มีการทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นการหาน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้อีกทั้งยังเป็นการยืนยันความบริสุทธิ์ของคอลลาเจนอีกทางหนึ่งด้วย

6.2.2 ควรทำการการทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity) โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์อันจะนำมาเพื่อลดต้นทุนการนำเข้าคอลลาเจนจากต่างประเทศที่มีราคาแพง

6.2.3 จากกราฟการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) จะมีพีคเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 100.7, 72.4 และ 82.3 องศาเซลเซียส ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ตามลำดับ ซึ่งอาจจะเกิดจากการตกค้างของกรดที่ใช้ในการสกัด ดังนั้นการแก้ไขอาจจะกระทำการวิเคราะห์โดยการทดสอบแบบ Second-Run เนื่องจากต้องการวิเคราะห์เพียงอุณหภูมิในการเสียสภาพ (T_d) ของคอลลาเจนเท่านั้น ครั้งแรกจึงเป็นการ Run เพื่อไล่เอากรดที่ตกค้างออกไปโดยใช้อุณหภูมิช่วง 110 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการลดอุณหภูมิลงเพื่อทำการ Run ครั้งที่สองสำหรับการทดสอบอุณหภูมิในการเสียสภาพ (T_d) ของคอลลาเจน ถ้าผลจากการทำ Second-Run ทำให้พีคที่ 100.7, 72.4 และ 82.3 องศาเซลเซียส หายไปแสดงว่าพีคที่เกิดขึ้นเป็นพีคที่เกิดจากกรดที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนที่ตกค้างอยู่ในคอลลาเจนที่สกัดได้

6.2.4 จากผลความเข้มข้นของกรดที่ส่งผลต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ สามารถสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของกรด 0.1 โมลาร์ ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มากกว่าที่ความเข้มข้นของกรด 0.3 และ 0.6 โมลาร์ เพื่อเป็นการยืนยันถึงผลการทดลองที่ได้จึงควรทำการทดสอบที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.1 โมลาร์ ด้วย

เอกสารอ้างอิง

[1] มาลัยวรรณ อารยะสกุลและวรรณวิบูลย์กาญจนกุญชร. (2549). **เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.** **ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.**

[2] Elzbieta, S. and Maria, S. (2007). The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod. **Food Chemistry,** 105, 1302–1306.

[3] Shao, K. Z., Chao, H Z.at al. (2009). Isolation and characterisation of acid solubilised collagen from the skin of Nile tilapia. **Food Chemistry, 116,** 879–883.

[4] Inwoo, B., Kiyoshi O.at al. (2008). Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilisedfishes. **Food Chemistry, 108,** 49–54.

[5] Shao, K. Z., Juanjuan, Y.al. (2012). Structure and characteristics of acid and pepsin solubilized collagens from the skin of cobia. **Food Chemistry, 135,** 1975–1984

[6] Bailey, A.J. and Light, N.D. (1989). Connective Tissue in Meat and Meat Product Elsevier Sciences Publishers. **Meat Science,** 59, 343–351.

[7] Ward, A.G. and Courts, A. (1977). The Science and Technology of Gelatin. **Academic Press.**

[8] Friess, W. (1998). Collagen – biomaterial for drug delivery. **Eur. J. Phar.andBiophar,** 45, 113-136.

[9] Foegeding, E.A., Lanier, T.C. and Hultin, H.O. (1996). Characteristics of Edible Muscle Tissues. **Food Chemistry,** 879-942.

[10] Bendall, J.R. (2009). Isolation of collagen from the skins of Baltic cod. **Food Chemistry,** 81:257-262.

[11] Ree, M., Kwon, S.H., (1991). Functional properties change of pigskin collagen by chemical modification. **AJAS,** 4, 407-410.

[12] Piez, K.A. (1985). Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. **Wiley,** 3, 699-727.

[13] ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์. (2551). **คอลลาเจนจากเกล็ดปลา การสกัดและคุณสมบัติบางประการของคอลลาเจน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

[16] Bailey, A.J. and Light, N.D. (1990). Connective Tissue in Meat and Meat Product Elsevier Sciences Publishers. **Meat Science**, 59, 343–351.

[18] **ปราณีอ่านเปรื่อง. (2547). เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์** มหาวิทยาลัย.

[19] ชัยณรงค์ คันธพนิต. (2529). **วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์**. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.

[20] Terence W. G., Rowe, P. and John, W. (1978). **Freeze - Drying Handbook.**

[21] Cengel, Y. A., and Boles, M. A. (2007). **Thermodynamics: An Engineering Approach**. 6th edition, Singapore: McGraw-Hill.

[22] Borgnakke, C., and Sonntag, R.E. (2009). **Fundamentals of Thermodynamics**. 7th edition.Asia: John Wiley & Sons.

[23] Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu,T., Kida, K. (2002). Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**, 37, 1403–1412.

[24] Maria, S., Ilona, K.O. and Celina, N. (2009). Isolation of collagen from the skins of Balticcod. **Food Chemistry**, 81, 257-262.

[25] Mingyan, Y. at al. (2008). Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleyepollock. **Food Chemistry**, 107, 1581–1586.

[26] Fu, Y.C., Feng, W.H., His, S.C., Liang, C.L., Ryoichi, S. (2009). Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. **Food Chemistry**, 113, 563–567

[27] Mehraj A., Soottawat B., Sitthipong N. (2010). Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket. **Food Hydrocolloids**, 24, 588-594.

[28] Takeshi, N., Nobutaka, S., Yasuhiro, T., Norihisa, K., Toshio, N. (2010). Characterization of Acid-Soluble Collagen from Skins of Surf Smelt. **Food and Nutrition Sciences**, 1, 59-66.

[29] Elzbieta, S. and Maria, S. (2007). The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod. **Food Chemistry**, 105, 1302–1306.

[30] Isarawut. P., Sorada K., Tanom B., Voranuch T., Siriporn D. (2008). Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. **Wiley Periodicals**, Inc. J Biomed Mater Res Part B: ApplBiomater 85B, 210–219.

[31] Vairamani, S. at al. (2012). Extraction structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of Sepiellainermis. **African Journal of Biotechnology**, 11, 14326-14337.

[32] Petrucci, R.H., Harwood, W.S. and Herring, F.G. (2002). General Chemistry, 8th edition, Prentice-Hall, 666.

[33] EurofinsBiolab. (1999). Cytotoxicity elution test, ISO10993-5: 910-1 SAMi.

[34] อ.ดร.วีรชัย พุทธวงศ์. (2549). **การใช้สเปคโตรสโคปีในการพิสูจน์สารประกอบอินทรีย์**. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

[35] Shakhashiri, B.Z. (2009). Determination of Molecular Structure by Molecular Spectroscopy. Chemistry, 103.

[36] David R. E. and Jiann, J. W. (2005). Collagen Cross-Links. **Top Curr Chem**, 247, 207–209.

[37] Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J.,Walsh, D., and Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of Pagrus major and Oreochromisniloticas. **International Journal of Biological Macromolecules**, 32, 199–204.

[38] Raston, P.L. and Anderson, D.T. (2006). Phys Chemistry, 8, 3124-3129.

ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบและสมการการคำนวณ

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ก.1 ข้อมูลการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ หนังหมูแห้ง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณคอลลาเจนที่ได้	
	dried collagen (g)	%yield
1	0.05	1
3	0.07	1.4
6	0.27	5.4
12	0.33	6.6
24	0.42	8.4
48	0.47	9.4
72	0.49	9.8

ตารางที่ ก.2 ข้อมูลการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ หนังหมูแห้ง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณคอลลาเจนที่ได้	
	dried collagen (g)	%yield
1	0.0166	0.332
3	0.0179	0.358
6	0.03	0.6
12	0.45	9
24	0.47	9.4
48	0.49	9.8
72	0.51	10.2

ตารางที่ ก.3 ข้อมูลการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดไนตริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ หนังหมูแห้ง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณคอลลาเจนที่ได้	
	dried collagen (g)	%yield
1	0.035	0.7
3	0.0885	1.77
6	0.095	1.9
12	0.3168	6.336
24	0.4028	8.056
48	0.4105	8.21
72	0.395	7.9

ตารางที่ ก.4 ข้อมูลของการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดที่ 24 ชั่วโมง หนังหมูแห้ง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้น (โมลาร์)	ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้					
	กรดอะซิติก		กรดไฮโดรคลอริก		กรดไนตริก	
	กรัม	%	กรัม	%	กรัม	%
0.1	0.47	9.4	0.42	8.4	0.4028	8.056
0.3	0.2	4	0.1363	2.726	0.0323	0.646
0.6	0.148	2.96	0.1105	2.21	0.0123	0.246

ตารางที่ ก.5 การสกัดโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ 24 ชั่วโมง หนังหมูแห้ง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

ครั้งที่	ปริมาณคอลลาเจนแห้งที่ได้ (%)		
	0.1 โมลาร์	0.3 โมลาร์	0.6 โมลาร์
1	8.12	2.67	2.19
2	8.4	2.726	2.21

ตารางที่ ก.6 การสกัดโดยใช้กรดอะซิติกที่ 24 ชั่วโมง หนังหมูแห้ง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

ครั้งที่	ปริมาณคอลลาเจนแห้งที่ได้ (%)		
	0.1 โมลาร์	0.3 โมลาร์	0.6 โมลาร์
1	9.2	3.22	2.29
2	9.4	4	2.96

ตารางที่ ก.7 การสกัดโดยใช้กรดไนตริกที่ 24 ชั่วโมง หนังหมูแห้ง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

ครั้งที่	ปริมาณคอลลาเจนแห้งที่ได้ (%)		
	0.1 โมลาร์	0.3 โมลาร์	0.6 โมลาร์
1	8.019	0.61	0.21
2	8.056	0.646	0.246

ตารางที่ ก.8 แสดง Fourier transform - infra red spectral peak location and assignment for standard collagen [31]

Region	Standard	ASC	PSC	Assignment
Amide A	3289	3442	3440	NH Stretch coupled with hydrogen bond.
Amide B	2920	2923	2923	CH_2 asymmetrical stretch.
	2853	2853	2853	CH_2 asymmetrical stretch.
Amide I	1644	1646	1648	C=O Stretch/Hydrogen bond coupled with CN stretch.
Amide II	1637	1542	1542	NH bend coupled with CN stretch
	1450	1460	1458	CH_2 bend.
	-	-	-	COO – Symmetrical stretch.
	-	1391	1336	CH_2 wagging of Proline.
Amide III	1260	1249	1246	NH bend coupled with CN stretch.
	1078	1095	1090	C-O stretch.
	1021	1023	1024	C-O stretch.
	804	-	-	Skeletal stretch.
	-	668	669	Skeletal stretch.

ตารางที่ ก.9 แสดงความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ [34]

cm^{-1}	หมู่ฟังก์ชัน	รายละเอียด
3600-3400	O–H stetching	3650-3590 cm^{-1} (sh, w) แอลกอฮอลอิสระ 3400-3200 cm^{-1} (b) แอลกอฮอลที่เกิดพันธะไฮโดรเจน 3400-2400 cm^{-1} (vs, vb) กรดคาร์บอกซิลิก
3500-3200	N–H stretching	3200-3400 cm^{-1}(m) 1° เอมีนและเอมีด มี 2 แถบ 3200-3400 cm^{-1}(w) 2° เอมีนและเอมีด มี 1 แถบ
3300 (vs)	=C–H stretching	3300 cm^{-1} อัลไคน์ที่มี =C–H ที่ปลายโซ่
3100-3000 (w, sh)	=C–H stretching	อัลคีนและเบนซีน (อาจมีหลายพีค)
3000-2800	C–H stretching	หมู่ CH_3, CH_2 และ CH ของอัลเคน
2850-2780	C–H stretching	แอลดีไฮด์
2250-2225	C≡N stretching	ไนทริล (m)
2260-2100	C≡C stretching	อัลไคน์ (w) โมเลกุลที่สมมาตรจะไม่มีแถบนี้ปรากฏ
1820-1760 (s)	C=O stretching	แอนไฮไดรด์ (s) มี 2 แถบ
1800 (s)	C=O stretching	กรดคลอไรด์
1770 (s)	C=O stretching	แกมม่า-แลกโตน
1735 (s)	C=O stretching	เอสเทอร์
1725 (s)	C=O stretching	แอลดีไฮด์
1715 (s)	C=O stretching	คีโตน
1710 (s)	C=O stretching	กรดคาร์บอกซิลิก
1690-1650 (s)	C≡O stretching	เอไมด์
1650-1600 (w)	C=C stretching	อัลคีน
1650-1590 (s-m)	N–H bending	1° เอมีน
1650-1550 (w)	N–H bending	2° เอมีน
1620-1590 (s)	N–H bending	1° เอมีด
1550-1510 (s)	N–H bending	2° เอมีด
1600, 1580, 1500 และ1450	C=C stretching	เบนซีนและเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ ความเข้มไม่แน่นอน อาจมี 2 , 3 หรือมีทั้ง 4 แถบ
1520 (s) และ 1350 (s)	NO_2 bending	สารประกอบไนโตร
1465-1450	C–H bending	หมู่ CH_2
1450-1375	C–H bending	หมู่ CH_3
1400-1000	C–F stretching	สารประกอบฟลูออไรด์

สมการการคำนวณเปอร์เซ็นต์ไขมันที่กำจัดได้

$$\%\text{ไขมันที่กำจัดได้} = \frac{\text{น้ำหนักหนังหมูแห้งเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักหนังหมูแห้งสุดท้าย}}{\text{น้ำหนักหนังหมูแห้งเริ่มต้น}} \times 100$$

สมการการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของคอลลาเจนที่สกัดได้

$$\%\text{yield} = \frac{W_2}{W_1} \times 100$$

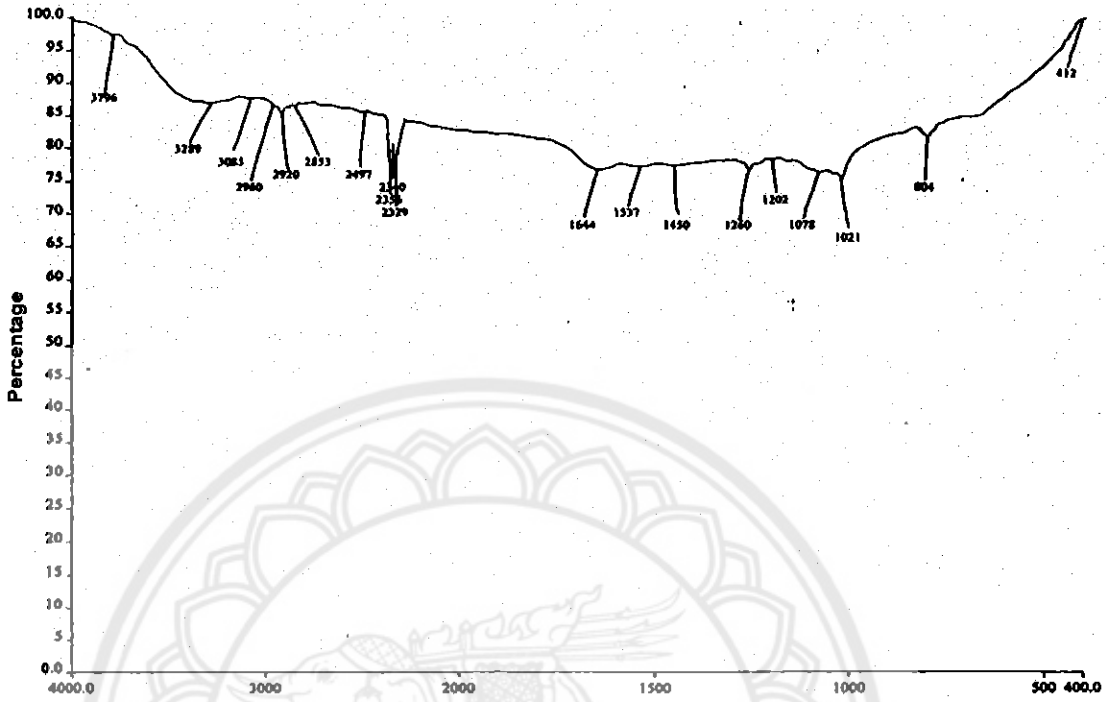
เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักหนังหมูแห้ง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักคอลลาเจนแห้ง (กรัม)

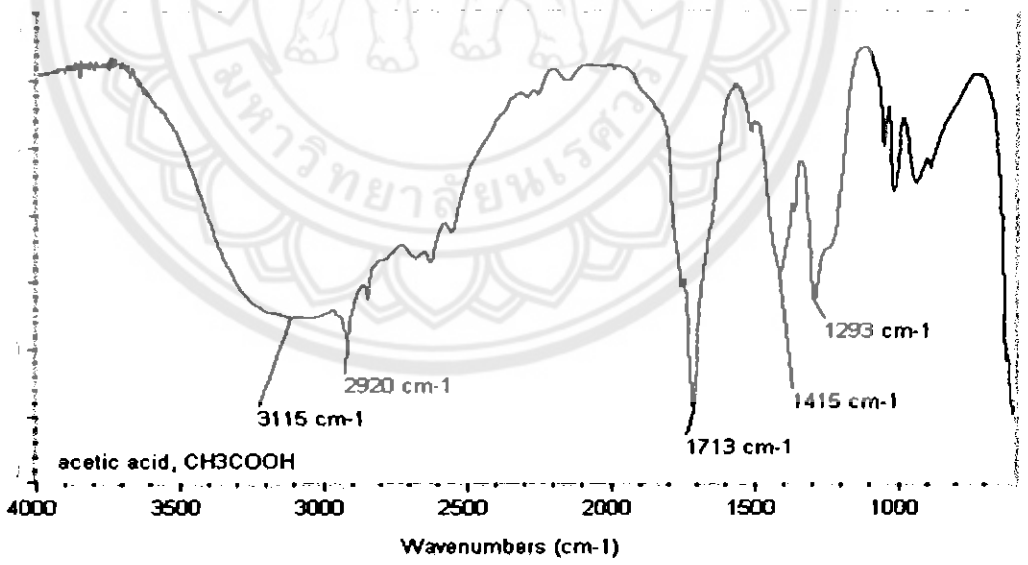
ภาคผนวก ข

ข้อมูลกราฟ FT-IR สเปคตรัมมาตรฐาน

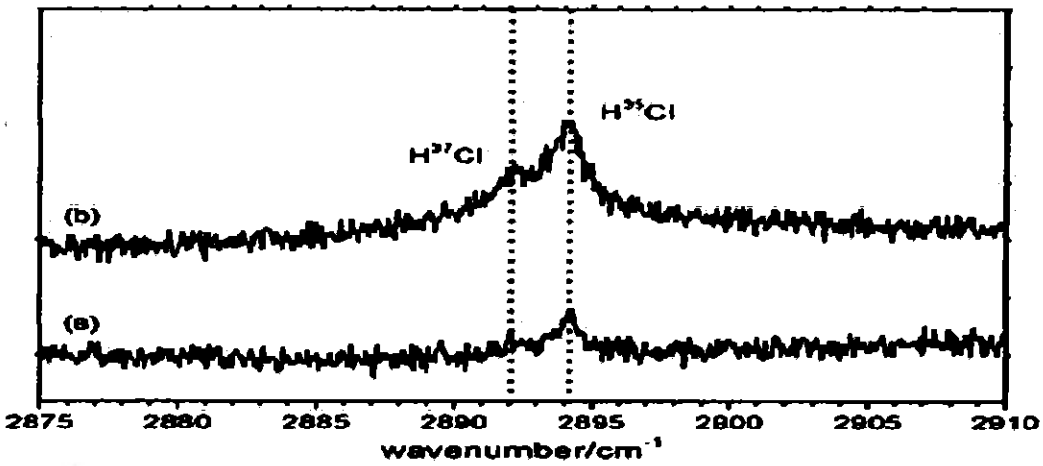
กราฟ FT-IR สเปคตรัมมาตรฐาน



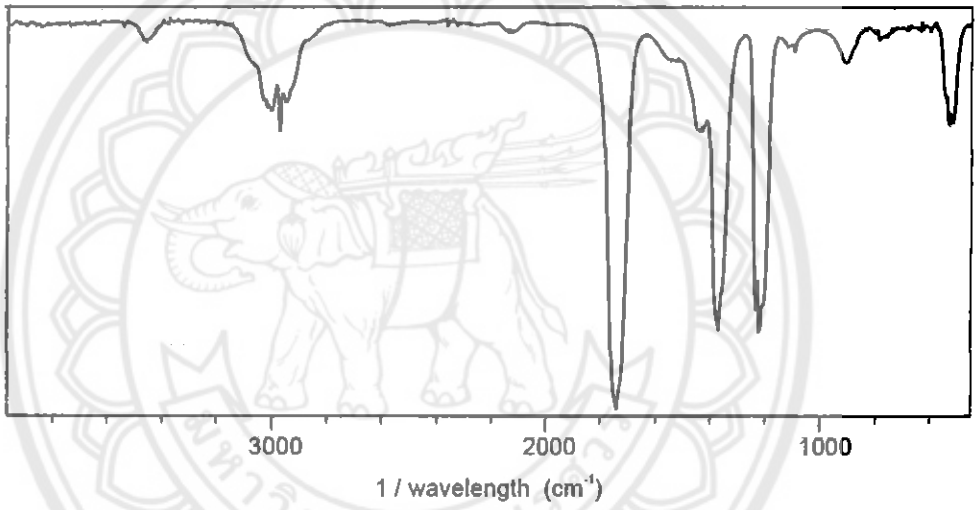
รูปที่ ข.1 แสดง FT-IR สเปคตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน (Type I collagen) [31]



รูปที่ ข.2 แสดง FT-IR สเปคตรัมของกรดอะซิติกมาตรฐาน [32]



รูปที่ ข.3 แสดง FT-IR สเปคตรัมของกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน [32]



รูปที่ ข.4 แสดง FT-IR สเปคตรัมของอะซิโตนมาตรฐาน [33]