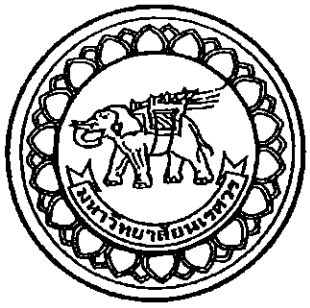


การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงโดยใช้กรด

EXTRACTION OF COLLAGEN FROM FISH SCALES BY USING ACID

นายเทิดศักดิ์ โครตะภู รหัส 52364988

ห้องสมุดคณะวิศวกรรมศาสตร์
วันที่รับ 25 / พ.ย. / 57
เลขทะเบียน 1655 0125
เลขเรียกหนังสือ ปร
มหาวิทยาลัยนเรศวร ว 713 ท 2555

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2555

ใบรับรองปริญญานิพนธ์

ชื่อหัวข้อโครงงาน การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงโดยใช้กรด

ผู้ดำเนินโครงงาน นายเทิดศักดิ์ โคตระภู **รหัส** 52364988

ที่ปรึกษาโครงงาน ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ภาควิชา วิศวกรรมอุตสาหการ

ปีการศึกษา 2555

.....

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

.....ที่ปรึกษาโครงงาน

(ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์)

.....กรรมการ

(ดร.นพวรรณ โม้ทอง)

.....กรรมการ

(ดร.ภมรรัตน์ จันธรรม)

.....กรรมการ

(อาจารย์อาภาภรณ์ จันทร์ปิรักษ์)

ชื่อหัวข้อโครงงาน	การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงโดยใช้กรด
ผู้ดำเนินโครงงาน	นายเทิดศักดิ์ โคตระภู รหัส 52364988
ที่ปรึกษาโครงงาน	ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
ภาควิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ
ปีการศึกษา	2555

.....

บทคัดย่อ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ได้ศึกษาผลของกรดที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนต่อเกล็ดปลากะพงโดยทำการทดลองสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงโดยใช้กรด 2 ชนิด คือ กรดอะซิติกและกรดไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้น 0.3-0.9 โมลาร์ และวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) และวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC)

จากผลการทดลองการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงด้วยวิธีการสกัดด้วยกรดอะซิติกและกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิช่วง 5-15 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการสกัด 12-72 ชั่วโมง อัตราส่วนเกล็ดปลากะพงต่อสารละลายกรด 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 0.3 0.6 และ 0.9 โมลาร์ พบว่าคอลลาเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มเวลาในการสกัด การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกและไฮโดรคลอริก ส่งผลทำให้ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้มีปริมาณลดลงและการสกัดด้วยกรดอะซิติกจะมีผลทำให้ให้ปริมาณคอลลาเจนสูงสุด การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีและการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกจะมีอุณหภูมิการเสียสภาพ (T_d) ที่ 149.9 องศาเซลเซียส

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือของหลายๆ ฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา แนะนำวิธีแก้ปัญหา รวมถึงข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความดูแลเอาใจใส่ ติดตามการดำเนินโครงงานมาโดยตลอด และขอขอบคุณคณะอาจารย์ประจำสาขาวิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่าน ที่ได้ให้วิชาความรู้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

นอกจากนี้ ยังต้องขอขอบคุณ ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรและคุณนภดล ยิ้มน้อย ที่ให้ความรู้และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ผล เพื่อใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้ดำเนินโครงงานใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้การดูแล อบรมสั่งสอนและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา ตลอดการดำเนินโครงงานจนสำเร็จการศึกษา

คณะผู้ดำเนินโครงงานวิศวกรรม

นายเทิดศักดิ์ โคตระภู

กรกฎาคม 2556

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 2

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน 2

1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน 3

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎี 4

2.1 คอลลาเจนและองค์ประกอบของคอลลาเจน 4

2.2 โครงสร้างคอลลาเจน 5

2.3 ชนิดคอลลาเจน 6

2.4 การสกัด (Extraction) 8

2.5 การนำไปใช้ประโยชน์ 8

2.6 กระบวนการสกัดคอลลาเจน 9

2.7 เกล็ดปลา 10

2.8 การทำแห้งเยือกแข็ง 12

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16

บทที่ 4 วิธีการทดลอง 19

4.1 สารเคมีและอุปกรณ์ 19

4.2 วิธีการทดลอง 21

4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติ 22

บทที่ 5 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ 23

5.1 ผลของสภาวะการสกัดคอลลาเจนที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ 23

5.2 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน 26

5.3 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของคอลลาเจน 28

บทที่ 6 บทสรุปและข้อเสนอแนะ 30

6.1 บทสรุป 30

6.2 ข้อเสนอแนะ 30

เอกสารอ้างอิง 31

ภาคผนวก ก 33

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน 2
2.1 ตารางแสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ 6
3.1 องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา Sea Bream ก่อนและหลังการกำจัดแคลเซียม 17
5.1 ปริมาณผลได้ภายหลังการทำแห้งแบบระเหิดที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ 25
5.2 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน 26

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างคอลลาเจน 4

2.2 โครงสร้างของสายคอลลาเจน Triple Helix 5

2.3 เกล็ดปลาชนิดต่างๆ ซึ่งแบ่งตามลักษณะโครงสร้าง 11

2.4 ตัวอย่างเกล็ดปลาของปลาบางชนิด 12

2.5 หลักพื้นฐานของกระบวนการทำแห้ง 13

4.1 กระบวนการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพง 20

5.1 แสดงผลของชนิดของกรดและเวลาที่ใช้ในการสกัด 24

5.2 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่มีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เวลาในการสกัดที่ 24 ชั่วโมง 25

5.3 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่มีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เวลาในการสกัดที่ 24 ชั่วโมง 25

5.4 องค์ประกอบ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน 27

5.5 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้ 28

5.6 DSC ของคอลลาเจนที่สกัดได้ 28

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงาน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบมากในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมและมีปริมาณมากที่สุดของโปรตีนภายในร่างกาย คอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลักของ ผิวหนัง เอ็น กระดูก และหลอดเลือด ซึ่งปริมาณของคอลลาเจนที่แตกต่างกันจะขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อและอายุของสัตว์ โครงสร้างคอลลาเจนจะมีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโนชนิดต่างๆ มีผลทำให้คุณสมบัติโดยทั่วไปของคอลลาเจนมีความแตกต่างกันโดยชนิดคอลลาเจนที่พบส่วนใหญ่จะเป็นคอลลาเจนชนิด Type I และ Type II ซึ่งคอลลาเจนทั้ง 2 ชนิดนี้จะพบมากในผิวหนังและกระดูก คอลลาเจนสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ อาทิเช่นเป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรมใช้ในด้านความงามและเครื่องสำอาง อีกทั้งยังใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อาทิ เนื้อเยื่อกระดูกและผิวหนัง เนื่องจากคอลลาเจนมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ กล่าวคือ เมื่อนำมาประยุกต์ใช้จะไม่เกิดการต่อต้านของร่างกาย นอกจากนั้นคอลลาเจนยังเสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นแผ่นปิดแผลชีวภาพหรือทำเป็นกระดูกเทียม ซึ่งข้อดี คือ เมื่อใช้แล้วคอลลาเจนสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) และยังเสริมโครงร่างให้แก่แผลได้อีกด้วย และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย [1]

ในปัจจุบันการสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้ทั้งวิธีการใช้เอนไซม์และสารเคมี เช่น กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก โดยวัตถุดิบที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดคอลลาเจนส่วนใหญ่มาจากสัตว์ อาทิเช่น ผิวหนังวัว เกล็ดปลา กระดูกและเอ็น จากรายงานการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพง โดยใช้เอนไซม์เปรียบเทียบกับกรด พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดนั้นจะทำให้พันธะระหว่างโมเลกุลเกิดการแตกตัว ทำให้โครงสร้างมีการพองตัว ช่วยในการสกัดคอลลาเจนออกมาได้ง่าย [2]

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ปลาเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากซึ่งทำให้มีของเสียจากการแปรรูปสูงไปด้วย อาทิเช่น เกล็ดปลา จากรายงานการศึกษาพบว่าในเกล็ดปลามีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 61.5 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจน (Collagen) จึงทำให้เกล็ดปลาเป็นแหล่งคอลลาเจนใหม่ที่น่าสนใจ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้มุ่งเน้นในการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงโดยใช้

กรดโดยจะศึกษาถึงอิทธิพลชนิดของกรด ความเข้มข้นของกรดและเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณของคลอลาเจนที่สกัดได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

เพื่อศึกษาผลของกรดที่ส่งผลต่อปริมาณและสมบัติของคลอลาเจนที่ได้จากเกล็ดปลากะพง

1.3 ขอบเขตในการศึกษา

1.3.1ตัวแปรที่ควบคุม

1.3.1.1 ช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง คือ 25-30 องศาเซลเซียส

1.3.1.2 เกล็ดปลากะพง

1.3.2ตัวแปรต้น

1.3.2.1 ศึกษาผลของชนิดของกรด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก

1.3.2.2 ความเข้มข้นของกรดแต่ละชนิดในช่วง 0.3-0.9 โมลาร์

1.3.2.3 เวลาที่ใช้ในการสกัด 12-72 ชั่วโมง

1.3.2.4 อัตราส่วนของเกล็ดปลาต่อกรด 1:10 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

1.4 สถานที่ในการดำเนินการวิจัย

ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

กรกฎาคม พ.ศ.2555-มีนาคม 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														◄	►	

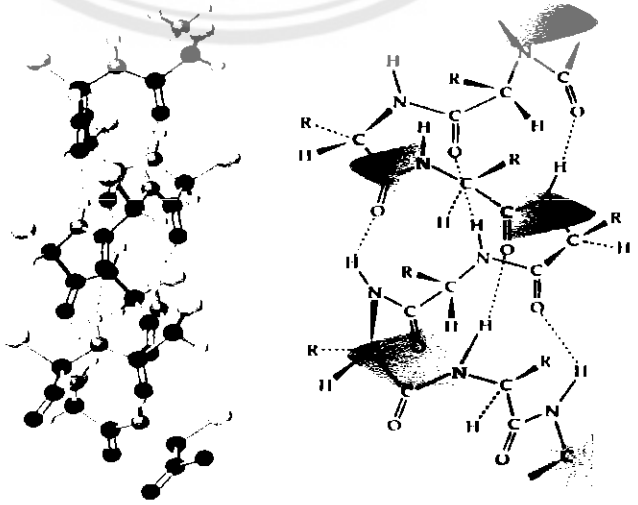
บทที่ 2

หลักการและทฤษฎีเบื้องต้น

2.1 คอลลาเจน (Collagen)

คอลลาเจนเป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีนเส้นใย (Fibrous Protein) จะพบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น เส้นเอ็น กระดูก ผิวหนัง ระบบท่อลำเลียงในสัตว์ รวมถึงแผ่นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบกล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้อเหนียว โปรตีนกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีคอลลาเจนประมาณร้อยละ 10 ส่วนในปลาจะมีปริมาณน้อยกว่า คอลลาเจนมีหลายชนิดทั้งที่ละลายในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง สารละลายกรด และบางชนิดก็ไม่ละลายในสารละลายชนิดใด

คอลลาเจน (Collagen) คือ โปรตีนโครงสร้างหลักที่พบในร่างกายสัตว์พบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) โดยในโปรตีนทั้งหมดจะมีคอลลาเจนอยู่ประมาณร้อยละ 30 ซึ่งคอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (Fibrous Protein) ที่พบมากที่สุดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของร่างกาย มีคุณสมบัติ อ่อนนุ่ม บิดงอได้ไม่ยืดหยุ่น เส้นใยจะไม่มีสีแต่เมื่ออยู่รวมกันเป็นมัด (Bundle) จะมองเห็นเป็นสีขาว แต่ละมัดจะประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนหลายๆ เส้นรวมกัน แต่ละเส้นใยมีความยาวมาก และยังมีเส้นใยขนาดเล็กลงไปอีกเรียกว่า Fibril ซึ่งประกอบด้วย Microfibril หลายๆ เส้นรวมกัน คอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen Fibers) จะทำให้เซลล์ต่างๆ คงรูปร่างได้ และเนื่องจากคอลลาเจนมีความสามารถในการทนแรงดึงสูง จึงทำให้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกระดูก กระดูกอ่อน ฟัน และทำให้ผิวหนังมีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นเมื่ออยู่รวมกับเคราติน (Soft Keratin) แต่เมื่อมันเกิดการเสื่อมสภาพจะทำให้เกิดเป็นรอยเหี่ยวย่นนอกจากนั้นคอลลาเจนยังทำให้หลอดเลือดแข็งแรงและกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ [2]



รูปที่ 2.1 โครงสร้างคอลลาเจน

2.2 โครงสร้างของคอลลาเจน

คอลลาเจนมีโครงสร้างประกอบไปด้วยสายพอลิเปปไทด์ที่ขดกันเป็นเกลียวและหมุนไปทางซ้าย (Left-Handed Helix Polypeptide Chain) 3 สายมาพันกันเป็นเกลียวอีกครั้ง โดยทิศทางการบิดของเกลียวจะหมุนไปทางด้านขวา (Righ-Handed Coiled Coil) ได้โครงสร้างที่เรียกว่า ฮีลิกซ์สามสาย (Triple Helix) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยภายในสายพอลิเปปไทด์แต่ละสายจะเกิดจากชุดของกรดอะมิโนของ (Gly-X-Y)n มาเรียงตัวต่อๆ กันไปเป็นสายของพอลิเมอร์ที่ยาวขึ้น โดย Gly คือ Glycine(Gly) X และ Y ส่วนใหญ่เป็น Proline (Pro) และ 4-Hydroxyproline (Hyp) โดย Hyp ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Pro ที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH Group) ลงใน Pro โดยอาศัยเอนไซม์ และมีโค-แฟคเตอร์เป็นกรดแอสคอบิค (Ascorbic Acid) หรือวิตามินซีช่วยในการเกิดปฏิกิริยาในชุดของกรดอะมิโน โครงสร้างของคอลลาเจนจะมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อม ซึ่งจะมีผลทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงและคงตัวมากขึ้น ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ได้ยาก นอกจากนั้นโมเลกุลคอลลาเจนที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกันได้ คอลลาเจนไฟบริล (Collagen Fibril) และคอลลาเจนไฟบริลรวมกันเป็นคอลลาเจนไฟเบอร์ (Collagen Fiber) [2]

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของสายคอลลาเจน Triple Helix

2.3 ชนิดของคอลลาเจน [3]

คอลลาเจนที่พบในปัจจุบันมีทั้งหมดกว่า 30 ชนิด โดยการแบ่งประเภทของคอลลาเจนแบ่งตามมวลโมเลกุล การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน ความยาวของสายฮีลิกซ์ และคุณสมบัติของส่วนที่ไม่เป็นสายฮีลิกซ์ คอลลาเจนชนิดที่พบมากก็คือ คอลลาเจน Type I, II, III และ IV ซึ่งในการศึกษามักจะใช้คอลลาเจน Type I เนื่องจากมีปริมาณมากและมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในวงการแพทย์ ซึ่งคอลลาเจน Type I นี้พบได้ส่วนใหญ่ในสัตว์ชั้นสูงในส่วนของเอ็น หนัง และกระดูก ซึ่งจะประกอบด้วย 3 สาย ได้แก่ สายα1(I) จำนวน 2 สาย และ α2(I) จำนวน 1 สายซึ่งสาย α1(I) และ α2(I) จะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน คอลลาเจนชนิดนนี้จะพบกรดอะมิโนชนิดไกลซีนประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด มีส่วนที่ไม่บิดเป็นเกลียวสั้น ประกอบด้วยไทโรซีนและฮิสติดีน ไม่พบทริปโตเฟนและซีสเตอีน

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ [3]

Collagen Type	Chain Compossition	Tissue Distribution
I	$(\alpha1(I))_2$ $\alpha2(I)$ trimer$(\alpha1(I))_3$	Skin, tendon, bone, cornea, dentin fibrocartilage
II	$(\alpha1(II))_3$	Hyaline cartilage, vitreous, nucleus pulposus, notochord
III	$(\alpha1(III))_3$	Large vessels, uterine wall, dermis, intestine hear, valve, gingiva (usually coexists with type I except in bone, tendon, cornea)
IV	$(\alpha1(IV))_2\alpha2(IV)$	Basement membranes in all organs
V	$\alpha1(V)$ $\alpha2(V)(3(V)$ or $(\alpha1(V))_2\alpha2(V)$ or $(\alpha1(V))_3$	Cornea, placental membranes, bone, large vessels, hyaline cartilage, gingival, tendons, interstitial tissues
VI	$\alpha1(VI)$ $\alpha2(VI)$ $\alpha3(VI)$	Descemet's membrane, skin, nucleus pulposus, heart muscle, liver, kidney

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ (ต่อ)

Collagen Type	Chain Composition	Tissue Distribution
		perichondrium
VII	$(\alpha 1(VII))_3$	Skin, placenta, lung, cartilage, cornea, epidermal/dermal junction
VIII	α1(VIII) α2(VIII) chain organization of helix unknown	Produced by endothelial cells, Descemet's membrane
IX	α1(IX) α2(IX) α3(IX)	Cartilage
X	$(\alpha 1(X))_3$	Hypertrophic and mineralizing cartilage
XI	1α2α3α1 or α1(XI)α2(XI) α3(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
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

2.4 การสกัดคอลลาเจน [4]

การสกัดคอลลาเจนมีหลายวิธี โดยขั้นตอนแรกก่อนการสกัดจะเริ่มต้นจากการทำความสะอาดวัตถุดิบ เพื่อกำจัดสารอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน อย่างเช่น แคลเซียม แล้วจึงค่อยทำการสกัดคอลลาเจนที่มีอยู่ให้ละลายออกมาด้วยวิธีการต่างๆ

การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรด (Acid Soluble Collagen)

คอลลาเจนสามารถละลายได้ในสารละลายกรดเจือจาง อย่างเช่น พวกอะซิตริก พันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัว กรดจะมีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าสารละลายเกลือ คอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดเจือจางจะเป็นคอลลาเจน Type I

การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายเกลือ (Neutral Salt Soluble Collagen)

การใช้สารละลายเกลือในการสกัดคอลลาเจนจะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ อัตราการเขย่าและปริมาตรของสารละลายเกลือที่ใช้สกัดต่อเนื้อเยื่อ แล้วทำให้คอลลาเจนบริสุทธิ์ด้วยการไดอะไลซ์ การตกตะกอน และการเหวี่ยงแยก คอลลาเจนที่สกัดได้จะประกอบด้วยคอลลาเจน Type I และ Type III เล็กน้อย

การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์เปปซิน (Pepsin Soluble Collagen)

การสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้คอลลาเจนที่ยังคงมีบริเวณที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว ที่เรียกว่า ส่วนทีโลเปปไทด์ ซึ่งจะไม่สามารถจะนำคอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดไปใช้ในทางการแพทย์ได้เพราะจะทำให้เกิดอาการแพ้ การแก้ปัญหาดังกล่าวจึงนำเอนไซม์มาใช้ร่วมในการสกัด โดยส่วนใหญ่ที่ใช้ คือ เอนไซม์เปปซิน โดยเปบซินจะมีความจำเพาะในการตัดพันธะที่ส่วนทีโลเปบไทด์ซึ่งเป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Amino Acid) ทำให้ทีโลเปบไทด์ถูกกำจัดออก [2]

2.5 การใช้ประโยชน์ [5]

ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขว้างในหลายๆ ด้านอาทิ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร ใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม ใช้เป็นแคปซูลยา ใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิว ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง และเครื่องสำอางการถ่ายรูป เป็นต้น และโดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ปัจจุบันได้รับความนิยมในการนำคอลลาเจนมาประยุกต์ใช้งานมากขึ้น อาทิ ผิวหนังเทียมสำหรับผู้ป่วยแผลไฟไหม้ ไหมเย็บแผล

2.6 กระบวนการสกัดคอลลาเจน [6]

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการล้างทำความสะอาดวัตถุดิบก่อน แล้วจะกำจัดส่วนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออก เช่น ไขมันและโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลา-เจน จากนั้นจึงนำไปทำการสกัดคอลลาเจนโดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

2.6.1 การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรด (Acid Soluble Collagen)

การสกัดคอลลาเจนที่สามารถละลายในสารละลายกรดส่วนมากจะใช้กรดอะซิติกซึ่งกรดจะมีประสิทธิภาพในการสกัดคอลลาเจนได้มากกว่าการใช้สารละลายเกลือ ซึ่งจะทำให้พันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัวโดยกรดแล้วทำให้ประจุบนโทโปคอลลาเจนผลักกัน จึงทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัวขึ้นจึงทำให้คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรดส่วนมากจะเป็นคอลลาเจนชนิด Type I ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการไฮโดรไลซิส คือ กระบวนการที่เป็นปฏิกิริยาที่มีน้ำเข้าไปทำปฏิกิริยาทำให้สารตั้งต้นหลุดออกไฮโดรไลซิสของเกลือ หมายถึง ปฏิกิริยาระหว่างเกลือกับน้ำ เกลือเป็นอิเล็กโทร-ไลต์แก่ เมื่อเกลือละลายในน้ำ เกลือจะแตกตัวออกเป็นไอออนบวกและไอออนลบทั้งหมด ดังนั้นสมบัติของสารละลายของเกลือ จึงขึ้นอยู่กับไอออนบวกและไอออนลบในสารละลาย ไอออนบางตัวสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับน้ำและให้ H^+ หรือ OH^- จึงเรียกปฏิกิริยานี้ว่า ไฮโดรไลซิส สำหรับไอออนบวก เช่น $NH4^+(aq)$ เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ จะเขียนสมการได้ดังนี้

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

จะเห็นว่าจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไอออนบวก NH_4^+ (aq) ที่เกิดขึ้น NH_4^+ จะให้โปรตอนกับ H_2O (l) แล้วได้ H_3O^+ (aq) ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงมีสมบัติเป็นกรด สำหรับไอออนลบ เช่น $CH3COO^-$ เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ จะเขียนสมการ

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

จะเห็นว่าจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไอออนลบ CH_3COO^- ที่เกิดขึ้น CH_3COO^- (aq) จะรับ H^+ จากน้ำแล้วได้ OH^- (aq) ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงมีสมบัติเป็นเบส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า "ถ้าไอออนลบของเกลือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะทำให้สารละลายแสดงสมบัติความเป็นเบส และถ้าไอออนบวกของเกลือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะทำให้สารละลายแสดงสมบัติความเป็นกรด"

2.6.2 การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์ (Enzyme Soluble Collagen)

การสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้โครงสร้างโมเลกุลของคอลลาเจนที่ยังคงมีบริเวณส่วนที่เป็นทีโลเปปไทด์ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการแพ้เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันปัญหาจึงนำเอนไซม์มาใช้ในการสกัดเพื่อช่วยในการกำจัดส่วนทีโลเปปไทด์ ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ คือ เอนไซม์เปปซิน เนื่องจากมีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยในช่วงที่ pH 2 ซึ่งเป็นช่วงที่ใกล้เคียงกับ pH ที่ใช้ในการสกัดด้วยกรดโดยเอนไซม์เปปซินจะสามารถทำงานได้ดีที่ pH ต่ำๆ ถึงจะมีประสิทธิภาพในการสกัดคอลลาเจนจึงทำให้เส้นใยคอลลาเจนพองตัวขึ้นทำให้ส่วนของทีโลเปปไทด์ถูกกำจัดได้ง่ายขึ้น โดยเปปซินจะมีความจำเพาะในการตัดพันธะที่ส่วน ปลายของโทโปคอลลาเจนทั้งปลาย N- และ C- ออกหรือส่วนทีโลเปปไทด์ออก ซึ่งเป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Amino Acid) ค่อนข้างสูงทำให้ได้ส่วนของเปปไทด์เล็กๆ ละลายอยู่และส่วนทีโลเปปไทด์จะถูกกำจัดออก ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งมีผลดีในการตัดส่วนนั้นออกเพราะส่วนดังกล่าวจะทำให้เกิดอาการแพ้ได้เมื่อนำไปใช้ทางการแพทย์

2.7 เกล็ดปลา [7]

ร่างกายของสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิดปกคลุมด้วยเกล็ด เกล็ดมีต้นกำเนิดมาจาก 2 แหล่งใหญ่ คือ ผิวหนังชั้นนอกและผิวหนังชั้นใน เกล็ดในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น เกล็ดงู มีต้นกำเนิดมาจากผิวหนังชั้นนอก เรียกเกล็ดชนิดนี้ว่า Epidermal Scale สำหรับเกล็ดปลาเรียกว่า Dermal Scale มีต้นกำเนิดจากผิวหนังชั้นใน เนื่องจากเป็นส่วนที่ยื่นออกมาภายนอกร่างกายและ ห่อหุ้มตัวปลา จึงอาจถือว่าเป็นโครงกระดูกภายนอก (Exoskeleton) ซึ่งบางครั้งจะเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Integumentary Skeleton ปลาบางชนิดไม่มีเกล็ด เช่น ปลาดุก ปลากระเบนไฟฟ้า ปลาบางชนิดมีเกล็ดขนาดเล็กมากและฝังแน่นในผิวหนัง เช่น ปลาไหล ปลาบางชนิดมีเกล็ดตามตัวเป็นหย่อมๆ หรือบางชนิดมีเพียง 2-3 แถวเท่านั้น เกล็ดของปลาบางชนิดแผ่เป็นแผ่นบางห่อหุ้มรอบตัว เกล็ดปลาบางชนิดยึดติดแน่นกับผิวหนังและบางชนิดหลุดง่าย

2.7.1 ชนิดของเกล็ดปลา [8]

เกล็ดปลามีโครงสร้างและส่วนประกอบแตกต่างกันไป อาจแบ่งเกล็ดออกตามลักษณะโครงสร้างได้ 2 ชนิดใหญ่ๆ ดังนี้

2.7.1.1 เกล็ดปลาพลาคอยด์ (Placoid Scale)

พบในกลุ่มปลากระดูกอ่อน ได้แก่ ปลาฉลามและปลากะเบน เกล็ดพลาคอยด์มีขนาดเท่าเดิม แม้ว่าปลาจะตัวโตขึ้น เกล็ดนี้จะปกคลุมตลอดทั้งตัวรวมถึงส่วนของครีบด้วย โดยจะมีการหลุดแต่สามารถสร้างขึ้นมาทดแทนได้ รูปร่างของเกล็ดอาจจะแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิดเช่น เป็นปุ่ม เป็นแผ่น การเรียงตัวของเกล็ดไม่เป็นแบบแผ่นต่อแผ่น แต่จะเหลื่อมกันไปเรื่อยๆ ยกเว้นบริเวณเส้นข้างตัว (รูปที่ 2.3 และรูปที่ 2.4)

2.7.1.2 เกล็ดน็อนพลาคอยด์ (Non-Placoid Scale) แบ่งออกเป็น

ก. เกล็ดคอสมอยด์ (Cosmoid Scale)

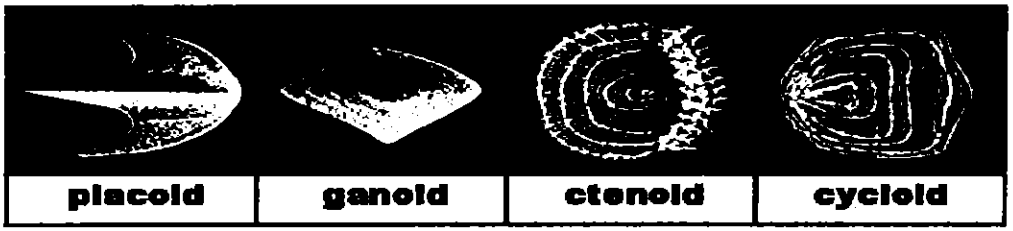
พบในซากดึกดำบรรพ์ของปลามีปอดและปลาซีลาแคนธ์ เป็นเกล็ดที่มีความแข็งแรงมากกว่าเกล็ดพลาคอยด์ เกล็ดคอสมอยด์มีการเจริญเฉพาะขอบที่อยู่ใต้ผิวหนังเท่านั้นส่วนที่โผล่ออกมาข้างนอกจะไม่เจริญ รูปร่างของเกล็ดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน (Rhomboid) หรือกลม (Cycloid) ปัจจุบันพบเฉพาะในปลาซีลาแคนธ์เท่านั้น ส่วนปลามีปอดได้มีวิวัฒนาการของเกล็ดเป็นแบบของปลาชั้นสูงไปแล้ว (รูปที่ 2.4)

ข. เกล็ดกานอยด์ (Ganoid Scale)

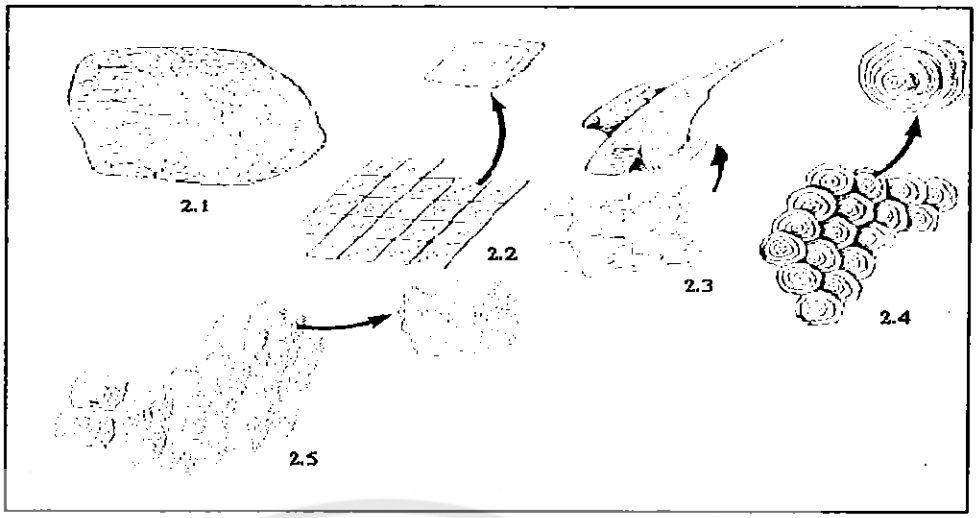
เกล็ดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูนหนาๆ มีหนามแหลมโผล่ขึ้นมาข้างบน เข้าใจว่ามีวิวัฒนาการมาจากเกล็ดคอสมอยด์ แยกออกได้เป็น 2 แบบ คือ เกล็ดพาลีออนีสคอยด์ (Palaeoniscoid Scale) และเกล็ดเลปิโดสตีออยด์ (Lepidostroid Scale) เกล็ดกานอยด์มีการเจริญได้ทุกส่วน รวมทั้งด้านที่โผล่ขึ้นมานอกผิวหนัง ปัจจุบันพบในปลาหรีด ปลาการ์ ปลาสเตอร์เจียน และปลาแพดเดิ้ล (รูปที่ 2.3 และรูปที่ 2.4)

ค. เกล็ดอีลาสมอยด์ (Elasmoid Scale) หรือ โบนี-ริดจ์ (Bony-Ridge Scale)

ปลาที่มีเกล็ดขอบเรียบ ส่วนใหญ่เป็นปลาที่มีวิวัฒนาการต่ำและเกล็ดหลุดง่าย เช่น ปลาหลังเขียว ปลากะตัก และปลาตะเพียน ปลาที่มีเกล็ดขอบหยักซึ่งส่วนใหญ่เกล็ดจะติดแน่นกับลำตัว เป็นปลาที่มีวิวัฒนาการสูง มีก้านครีบแข็ง และเกล็ดของปลานั้นอาจมีขนาดไม่เท่ากันตลอดลำตัว ซึ่งปลาที่มีลักษณะอย่างนี้ เช่น ปลาจวด ปลาหมอ และปลาสาก เป็นต้น



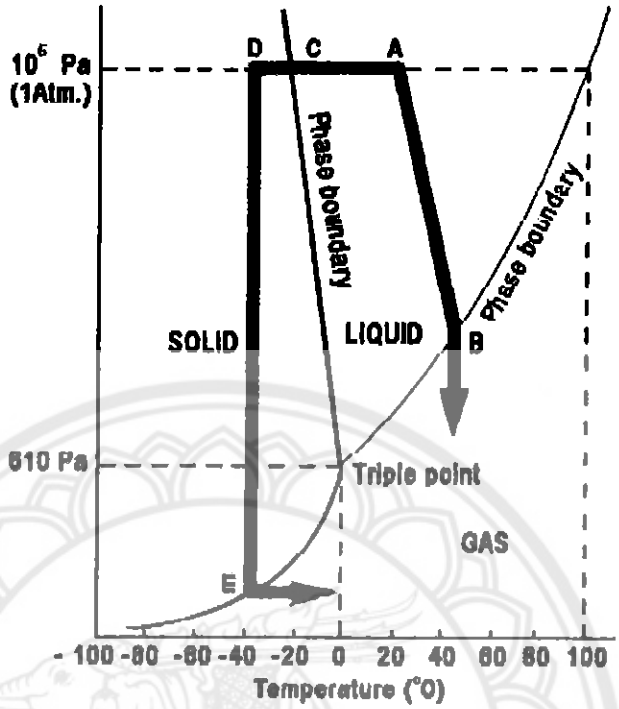
รูปที่ 2.3 เกล็ดปลาชนิดต่างๆ ซึ่งแบ่งตามลักษณะโครงสร้าง



รูปที่ 2.4 ตัวอย่างเกล็ดปลาของปลาบางชนิด; (2.1) เกล็ดคอสมอยด์ของปลามีปอด (2.2) เกล็ดกานอยด์ของปลาการ์ (2.3) เกล็ดพลาคอยด์ของปลาฉลาม (2.4) เกล็ดไซคลอย์ของปลาโบว์ฟิน และปลากระดูกแข็งทั่วไป และ (2.5) เกล็ดทีนอยด์ของปลาหมอและปลากระดูกแข็ง [9]

2.8 การทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Drying)

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) หรือการทำแห้งแบบระเหิด (Sublimation Drying) มีชื่อเรียกเฉพาะว่า "Lyophilization" เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำจึงช่วยให้ผลิตภัณฑ์คงคุณภาพทางโภชนาการเนื้อสัมผัสโครงสร้าง สี กลิ่น และรสชาดได้ใกล้เคียงกับของสด ผลิตภัณฑ์ที่นิยมนามาทาแห้งแบบเยือกแข็ง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง เช่น อาหาร เครื่องสำอางค์ ยา และผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ เป็นต้น เนื่องจากการทำแห้งแบบเยือกแข็งนี้มีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงทั้งเงินทุนและค่าใช้จ่ายดำเนินการ ดังนั้นการเลือกใช้เทคโนโลยีจึงต้องพิจารณาความต้องการของตลาดและปัจจัยสนับสนุนอื่นๆ ควบคู่กันไปด้วย



รูปที่ 2.5 หลักพื้นฐานของกระบวนการทำแห้ง [10]

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) ยกระดับอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อให้น้ำแข็งระเหิดเป็นไอได้อย่างสมบูรณแต่ในความเป็นจริงปริมาณความชื้นหรือน้ำที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ไม่ได้อยู่ในรูปของน้ำบริสุทธิ์ มักจะอยู่ผสมกับสารอื่นๆ ในรูปของตัวทำละลาย (Solvent) และตัวถูกละลาย (Solute) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของสาร ดังนั้นในการทำแห้งแบบเยือกแข็งกับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดจึงมีข้อแตกต่าง ข้อจำกัด และมีลักษณะเฉพาะของแต่ละผลิตภัณฑ์ไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างและ

องค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์นั้นๆ โดยรูปที่ 2.5 จะแสดงจุดต่างๆ ของน้ำ ดังนี้ จุดหลอมเหลว (Melting Point) คือ จุดที่ทำให้น้ำเปลี่ยนจากสถานะของแข็งกลายเป็นของเหลวที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เราสามารถเปลี่ยนน้ำจากสถานะของแข็งเป็นแก๊สโดยไม่ผ่านสถานะของเหลว (จากจุด D เปลี่ยนเป็นจุด E โดยไม่มีการผ่านสถานะที่เป็นของเหลว) ได้ จนความดันต่ำกว่า $6x10^{-3}$ 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

คุณลักษณะของการทำแห้งแบบเยือกแข็งกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีคุณลักษณะที่แตกต่างไปจากการทำแห้งโดยทั่วไป คือ เป็นการทำแห้งภายใต้อุณหภูมิและความดันต่ำ ใช้เวลาการทำแห้งนานเนื่องจากต้องการรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์สดมากที่สุด การทำแห้งแบบเยือกแข็งใช้อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน ในขณะที่การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Dryer) ใช้อุณหภูมิสูงในเวลาสั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่นำมาแปรรูปว่ามีองค์ประกอบทางเคมีสารออกฤทธิ์และคุณค่าอื่นๆ ที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากความร้อนมากน้อยเพียงไรผลิตภัณฑ์มีความจำเป็นและมีการตลาดรองรับเพียงพอ ข้อดี คือ ผลิตภัณฑ์มีความเสียหายต่ำ โครงสร้างผลิตภัณฑ์มีรูพรุนมากส่งผลให้ผลิตภัณฑ์สามารถคืนตัว (Rehydration) ได้อย่างรวดเร็วและข้อจำกัด คือ เครื่องมือมีราคาแพงกว่าการทำแห้งชนิดอื่นประมาณ 3 เท่าตัว มีความสิ้นเปลืองเวลาและพลังงานในการดำเนินการมาก

2.8.1 ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง [11]

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) โดยการระเหิดน้ำแข็งให้เป็นไอโดยการลดความดันบรรยากาศเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอออกไปจาก

ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระดับของสุญญากาศ (Vacuum) ควรอยู่ต่ำกว่า 132 ปาสคาล และ 132 มิลลิ-ปาสคาล ตามลำดับ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งจึงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์

การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง (Ice Layer) จะเริ่มจากชั้นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ระเหิดไปเป็นไอทำให้บริเวณนี้กลายเป็นชั้นแห้ง (Dry Layer) จากนั้นเป็นการระเหิดของชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ระเหิดผ่านชั้นแห้งออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาการระเหิดขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

2.8.1.3 การทำแห้งขั้นที่สอง (Secondary Drying)

เมื่อการทำแห้งขั้นต้นเสร็จสมบูรณ์น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นหลงเหลืออยู่จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออกถึงระดับความชื้นที่ปลอดภัยสาหรับการเก็บรักษา

บทที่ 3

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Akkasit Jongjareonrak และคณะ [12] ได้ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากะพงคางเหลือง พบว่ามีปริมาณคอลลาเจนส่วนที่ละลายในกรดและส่วนที่ละลายในเปปซินร้อยละ 9 และ 4.7 ของน้ำหนักเปียกตามลำดับ โดยคอลลาเจนประกอบด้วยสายโซ่แอลฟา 2 ชนิด คือ แอลฟา 1 และแอลฟา 2 ซึ่งสามารถจำแนกเป็นคอลลาเจนชนิด Type I ที่ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุล คอลลาเจนที่ละลายในเปปซินประกอบด้วยโมเลกุลที่เกิดจากการเชื่อมประสานกันระหว่างสายน้อยกว่าคอลลาเจนที่ละลายในกรด รูปแบบการย่อยสลายของคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอส V8 และเอนไซม์ไลซิลเอนโดเปปติเดสมีลักษณะใกล้เคียงกันบางประการ แต่แตกต่างจากคอลลาเจนชนิด Type I จากหนังลูกวัวอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งบ่งชี้ถึงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างของคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลากะพงคางเหลืองและหนังลูกวัว คอลลาเจนที่ละลายในกรดและเปปซินมีค่าการละลายสูงสุดในกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ pH 3 และ 4 ตามลำดับ แต่การละลายลดลงอย่างชัดเจนในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 2 และ 3 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับคอลลาเจนที่ละลายในกรดและเปปซินตามลำดับ อุณหภูมิสูงสุดที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของคอลลาเจนที่ละลายในกรดและเปปซินมีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าลดลงในสภาวะที่มีกรดอะซิติก ซึ่งบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วนของคอลลาเจนที่เป็นผลจากกรด

E. Skierka และคณะ [13] ได้ทำการศึกษาผลความแตกต่างของกรดและเอนไซม์เพปซินในการสกัดคอลลาเจนจากปลาค็อดโดยใช้สารละลายกรดซิตริก แลคติก และอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ดำเนินการสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในอัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย 1:6 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากการศึกษาพบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากกรดอะซิติกและกรดแลคติกให้ผลได้สูงสุดร้อยละ 90 คอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดซิตริกให้ผลได้ร้อยละ 60 และคอลลาเจนที่สกัดได้จากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ร้อยละ 18 หลังจากนั้นทาการสกัด คอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์เพปซินร่วมกับกรดผลที่ได้ คือ การสกัดคอลลาเจนจากโซเดียมคลอไรด์และกรดซิตริก ได้ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยกรดเพียงอย่างเดียว ร้อยละ 40 และร้อยละ 20 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์คอลลาเจนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) พบว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติกและกรดแลคติกจะให้คอลลาเจนที่มีโครงสร้าง

โมเลกุลครบ 3 สาย (Triple Helix) ส่วนคอลลาเจนที่สกัดจากเอนไซม์เพปซินร่วมกับโซเดียมคลอไรด์และกรดซิตริกทำให้โครงสร้างโมเลกุล 3 สาย ของคอลลาเจนถูกทำลายหรือผิดรูปไปจากเดิม

I. Bae และคณะ [14] ได้ทำการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกจากผิวหนังของปลาพบว่าปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลาสลิดดา ปลาสลิดทะเล ปลากระเบนนก ปลากระเบนแดง และปลากระเบนยันไต คอลลาเจนที่สกัดได้ประมาณร้อยละ 3.9, 3.4, 5.3, 5.7 และ 5.5 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ คอลลาเจนที่สกัดได้จัดเป็นคอลลาเจนชนิด Type I ซึ่งประกอบด้วยสาย α1 2 สาย และสาย α2 1 สาย โดยคอลลาเจนของสายพันธุ์ปลากระเบนจะมีการเสียสภาพที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่ากระดูกของปลาสลิดดาและปลาสลิดทะเล ค่าที่ทำให้คอลลาเจนเกิดการตกตะกอนอยู่ในช่วง pH 2-4

Fahmi และคณะ [15] ใช้เกล็ดปลา Sea Bream เป็นวัตถุดิบในการศึกษาการผลิตคอลลาเจนเปปไทด์ที่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสาร Angiotensin I (Angiotensin I Converting Enzyme: ACE, EC3.4.15.1) เป็น Angiotensin II ซึ่งมีผลทำให้ภาวะความดันโลหิตสูง โดยล้างทำความสะอาดเกล็ดปลาด้วยสัดส่วนเกล็ดแห้ง 100 มิลลิกรัมต่อสารละลาย Sodium Alginate 1 ลิตร ล้าง 10 ครั้ง และล้างออกด้วยน้ำประปา กำจัดแคลเซียมโดยแช่เกล็ดปลาในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.6 N ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของเกล็ดปลาในสารละลายเป็นร้อยละ 10 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลามีการเปลี่ยนแปลงไปดังตาราง จากนั้นจะย่อยเกล็ดปลาที่ได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสในสภาวะเป็นด่าง ซึ่งพบว่าเปปไทด์จะถูกย่อยเป็นสารไฮโดรไลเซตสูงถึงร้อยละ 92

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา Sea Bream ก่อนและหลังกำจัดแคลเซียม (%w/w) [15]

องค์ประกอบทางเคมี	เกล็ดปลาสด	เกล็ดปลาภายหลังการกำจัดแคลเซียม
โปรตีน	51.2	70.9
ไขมัน	0.1	0
สารอินทรีย์อื่นๆ	1.4	24.4
สารอนินทรีย์	47.3	4.7

S. Zung และคณะ [16] ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและลักษณะของคอลลาเจนจากหนังของปลาช่อนทะเลโดยใช้กรดอะซิตริกและเอนไซม์เปปซินในการสกัดคอลลาเจน พบว่า การสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละสายกรดอะซิติกมีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 35.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์มีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 12.3 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) คอลลาเจนที่พบเป็นคอลลาเจนประเภท Type I ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างโมเลกุลครบ 3 สาย คือ $\alpha 1$ $\alpha 2$ $\alpha 3$ จากการวิเคราะห์ทางความร้อนพบว่า คอลลาเจนเสียสภาพในกรดอะซิตริกและเอนไซม์เปปซินที่อุณหภูมิ 34.62 และ 33.97 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อุณหภูมิสูงสุดที่ทำให้เสียสภาพ คือ ที่การสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละลายกรดอะซิติก 38.17 องศาเซลเซียส และที่การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์ 36.03 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยกรดอะซิตริกมีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มากกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์เปปซิน

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 วัตถุดิบและสารเคมี

4.1.1 กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 99.8 ยี่ห้อ QRëC Grade AR

4.1.2 กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 37 ยี่ห้อ RCI Labscan Limited Grade AR

4.1.3 อะซิโตนยี่ห้อ RCI Labscan Limited Grade AR

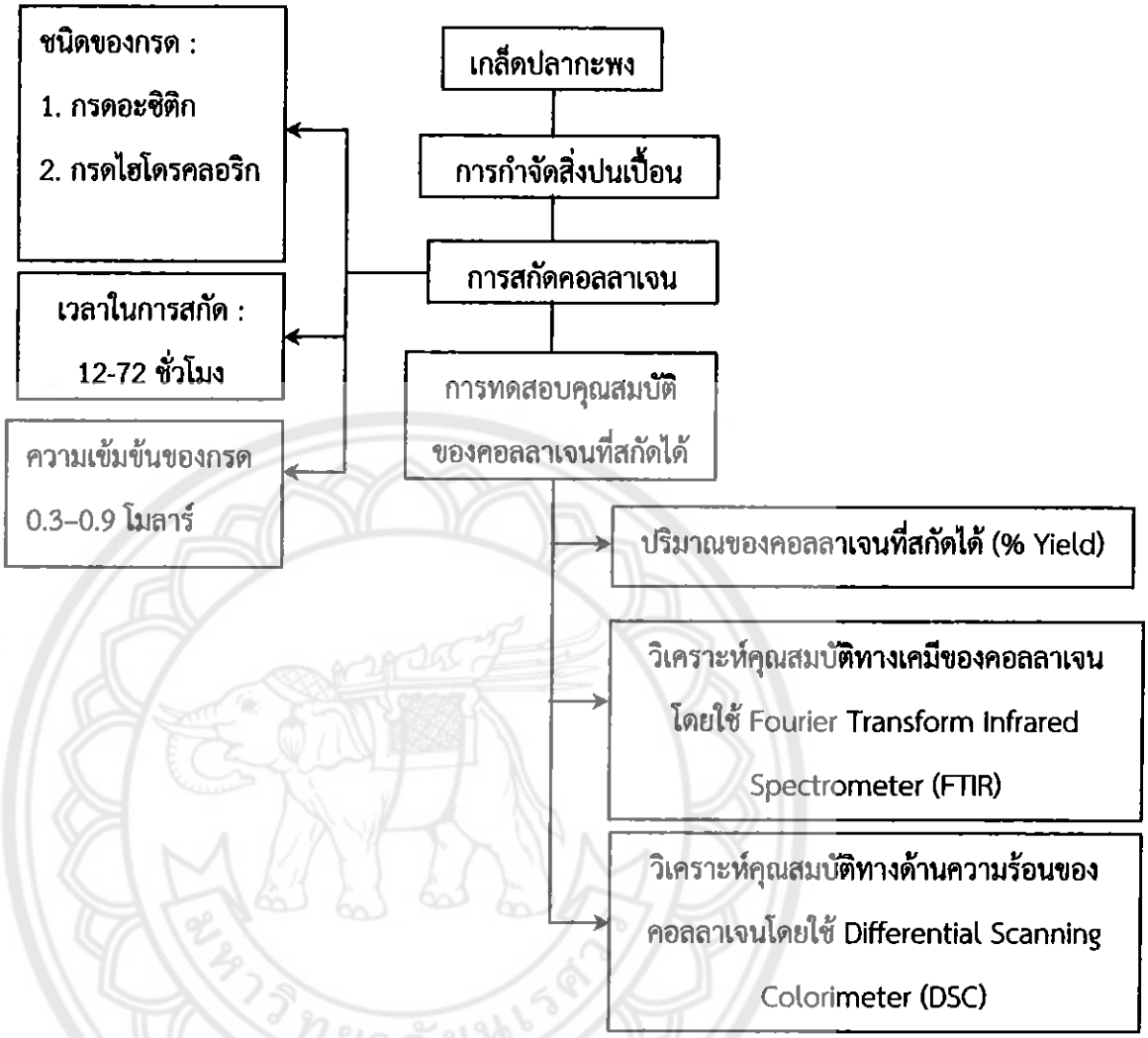
4.1.4 เกล็ดปลากะพง

4.1.5 Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

4.1.6 Differential Scanning Colorimeter (DSC)

4.1.7 เครื่องทาแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) ยี่ห้อ LABCONCO รุ่น FreeZone® 2.5 Liter Freeze Dry System

4.1.8 เครื่องปั่นกวน ยี่ห้อ IKA รุ่น RW20 Digital



รูปที่ 4.1 กระบวนการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพง

4.2 วิธีการทดลอง

ในการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงมีขั้นตอนการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.2.1 การเตรียมเกล็ดปลากะพง

นำเกล็ดปลากะพงมาทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดและนำมาตากแห้งแล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส

4.2.2 กระบวนการกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลา

การศึกษาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและเวลาในการกำจัดแคลเซียม โดยการแช่เกล็ดปลากะพงประมาณ 50 กรัม ในสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.2 N โดยใช้อัตราส่วนเกล็ดปลากะพงต่อกรดเป็น (1:10) (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ทำการกวนทุกๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วัด pH ของสารละลายหลังการกำจัดแคลเซียม จากนั้นนำเกล็ดปลาล้างน้ำจน pH 6–7 จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

4.3 กระบวนการสกัดคอลลาเจน

ในการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงจะมี การสกัดด้วยกรด 2 ชนิดโดยมีวิธีการสกัดดังนี้

4.3.1 วิธีการสกัดด้วยกรด

นำเกล็ดปลากะพงที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมมาสกัดคอลลาเจนด้วยกรดโดยใช้อัตราส่วนเกล็ดปลากะพงต่อกรด 1:10 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปปั่นกวนด้วยเครื่องกวนผสมที่อุณหภูมิ 15–20 องศาเซลเซียส และใช้น้ำเย็นในการควบคุมอุณหภูมิ โดยตัวแปรที่ทำการศึกษาในการสกัด ได้แก่ ชนิดของกรด คือ อะซิติกและไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นของกรดช่วง 0.3–0.9 โมลาร์ และเวลาในการสกัดในช่วง 12–72 ชั่วโมง

4.3.2 ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dry)

นำสารละลายคอลลาเจนที่สกัดได้นำมาแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -47 องศาเซลเซียส และความดัน 0.160 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้คอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้ง

4.4 วิธีการทดลอง

ในการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงจะมี การสกัดด้วยกรด 2 ชนิดโดยมีวิธีการสกัดดังนี้

4.4.1 การคำนวณหาร้อยละของคอลลาเจนที่สกัดได้

ในการคำนวณร้อยละของคอลลาเจนที่สกัดได้จะคำนวณจากน้ำหนักคอลลาเจนแห้ง (กรัม) ต่อน้ำหนักของเกล็ดปลากะพง (กรัม) คูณด้วย 100 ดังแสดงในสมการที่ (4.1)

$$\%\ \text{Yield} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากการทำแห้ง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเกล็ดปลากะพงหลังจากการอบ (กรัม)}} \times 100 \qquad (4.1)$$

4.4.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจน

ในการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนที่สกัดจะวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) นำคอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้งน้ำหนัก 0.1–0.2 มิลลิกรัม ผสมกับ Potassium Bromide (KBr) ประมาณ 10–15 มิลลิกรัม แล้วนำไปอัดขึ้นรูปให้เป็นแผ่นบางโดยวิเคราะห์ภายใต้คลื่นอินฟราเรดช่วง 4000-500 ซม$^{-1}$ อัตราการเก็บข้อมูล 2 ซม$^{-1}$ ต่อจุด และทำการสแกนจำนวน 128 ครั้ง

4.4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อน

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนโดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) นำคอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้ง 2–3 มิลลิกรัม ใส่ลงในถาดอะลูมิเนียม (Aluminum Pan) แล้วนำไปทดสอบด้วยเครื่อง DSC อัตราการให้ความร้อน 1 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยจะทำการศึกษาในช่วงอุณหภูมิ 25–100 องศาเซลเซียส [17]

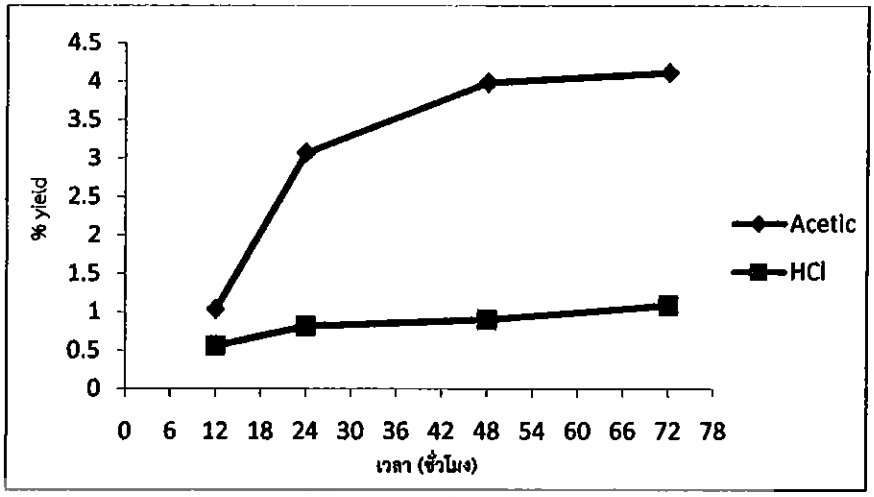
บทที่ 5

ผลการทดลองและการวิเคราะห์

5.1 ผลของเวลาและชนิดกรดที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน

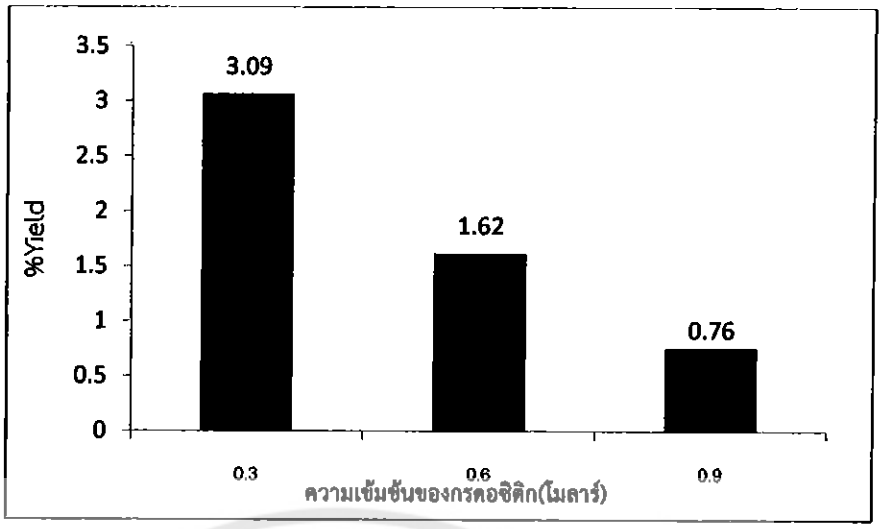
รูปที่ 5.1 แสดงผลของเวลาและชนิดของกรด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก และที่มีต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้และเวลาที่ใช้ในการสกัดในช่วง 0-72 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดถูกควบคุมที่ 0.3 โมลาร์ และ 5-15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติกที่การสกัด 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 1.36 เมื่อเพิ่มเวลาการสกัดคอลลาเจนเป็น 24 ชั่วโมง ปริมาณของคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 3.07 สำหรับการสกัดโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่การสกัด 12 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 0.56 เมื่อเพิ่มเวลาสกัดเป็น 24 ชั่วโมง ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.82 แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มเวลาในการสกัดเป็น 72 ชั่วโมง ของกรดทั้ง 2 ชนิดพบว่าไม่ส่งผลต่อปริมาณสูงสุดของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยที่ปริมาณคอลลาเจนที่ สกัดด้วยกรดอะซิติกและกรดไฮโดรคลอริกได้สูงสุด คือ ร้อยละ 4.11 และ 1.086 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงเวลาที่ใช้ในการสกัดโดยใช้กรดทั้ง 3 ชนิด พบว่าปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จะเข้าสู่สภาวะสมดุลเมื่อเวลาการสกัด 24 ชั่วโมง ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการสกัดที่เหมาะสม คือ 24 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาผลของชนิดของกรดที่มีต่อปริมาณคอลลาเจนพบว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติกให้ปริมาณคอลลาเจนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก เนื่องจากกรดอะซิติกเป็นกรดอ่อนมีฤทธิ์ในการกัดกร่อนต่ำกว่ากรดไฮโดรคลอริก ซึ่งจะส่งผลต่อขนาดของสายโมเลกุลของคอลลาเจน ในกรณีการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดที่มีฤทธิ์กัดกร่อนสูง เช่น กรดไฮโดรคลอริก ความแรงของกรดจะทำลายโมเลกุลส่งผลทำให้คอลลาเจนที่ได้มีความยาวของสายโซ่สั้นลงและทำให้คอลลาเจนไม่สามารถจัดเรียงตัวของเส้นใยให้มีความหนาแน่นสูงจึงส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่ได้จะมีค่าลดลง

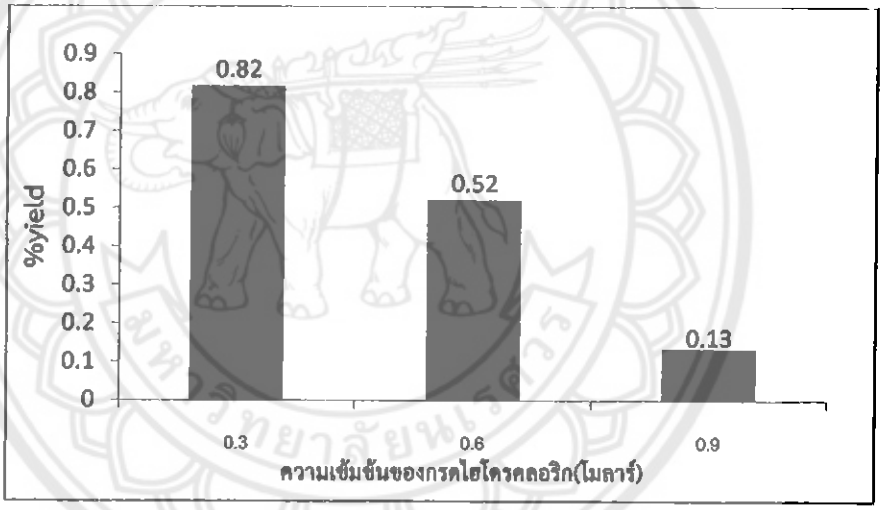


รูปที่ 5.1 แสดงผลของชนิดของกรดที่ 0.3 โมลาร์ และเวลาที่ใช้ในการสกัด

รูปที่ 5.2 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่มีต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการสกัดอยู่ในช่วง 0.3-0.9 โมลาร์ เวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดได้ควบคุมที่ 24 ชั่วโมง และ 5-15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการสกัด คอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ จะได้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 3.07 เมื่อ เพิ่มความเข้มข้นกรดเป็น 0.6 และ 0.9 โมลาร์ พบว่าปริมาณของคอลลาเจนลดลงเป็นร้อยละ 1.62 และ ร้อยละ 0.76 ตามลำดับ รูปที่ 5.3 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกพบว่าที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ให้ปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 0.82 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเป็น 0.6 และ 0.9 โมลาร์ ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ลดลงเป็นร้อยละ 0.52 และร้อยละ 0.13 ตามลาดับ และการสกัดโดยใช้กรดทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ กรดอะซิติกและกรดไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้สูงสุดร้อยละ 3.0 และ 0.82 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับตารางที่ 5.4 จากการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาจะพบว่าการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงด้วยกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จะมีปริมาณคอลลาเจนน้อยกว่าการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงที่มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ จะพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดในการสกัดคอลลาเจนจะส่งผลให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ลดลง เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นในการสกัดของกรดทั้ง 2 ชนิดจะส่งผลทำให้เกิดการทำลายสายโมเลกุลมากขึ้นซึ่งทำให้สายโมเลกุลคอลลาเจนมีสายที่สั้นมากทำให้ไม่สามารถยึดเกาะเป็นเส้นใยคอลลาเจนได้ การลดความเข้มข้นของกรดในการสกัดคอลลาเจนจะส่งผลให้ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากไม่มีผลที่ทำให้สายโซ่โมเลกุลของคอลลาเจนที่ได้มีขนาดสั้นลง



รูปที่ 5.2 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่มีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้



รูปที่ 5.3 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่มีต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

ตารางที่ 5.1 ปริมาณผลได้ (% yield) ภายหลังการทำแห้งแบบระเหิดที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ [16]

เกล็ดปลา	ปริมาณโปรตีนของการสกัดคอลลาเจนก่อนการตกตะกอนแยกคอลลาเจน Type I (ร้อยละน้ำหนัก)	ปริมาณผลได้ (% yield) ภายหลังการทำแห้งแบบระเหิด
เกล็ดปลากะพง	28 ± 0.35	0.83
เกล็ดปลานิล	26.43 ± 0.35	0.82

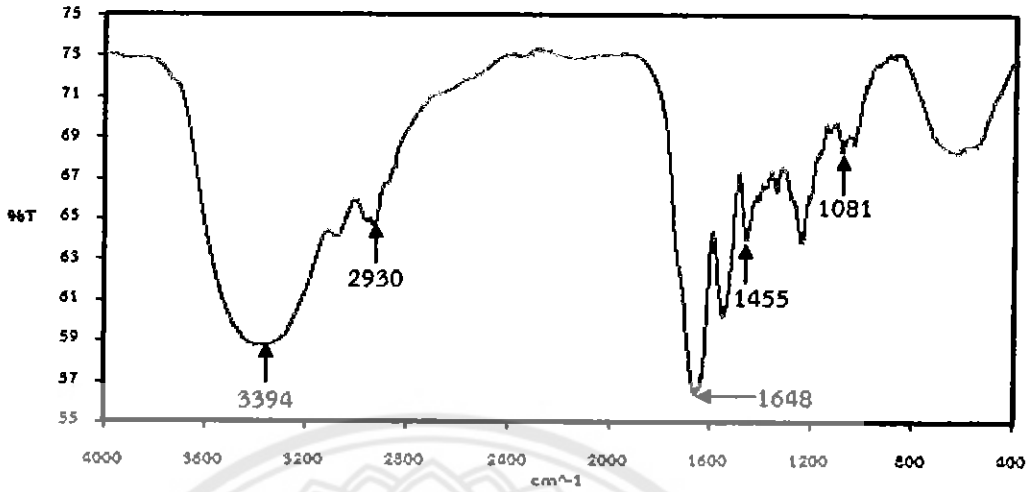
5.2 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน

ตารางที่ 5.2 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน [18]

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	1537	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.

จากตารางที่ 5.2 แสดง FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน โดยทั่วไปแล้วคอลลาเจน Type I ที่สกัดได้จะแสดงลักษณะของการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3298 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch ที่ตำแหน่ง 2920 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch ที่ตำแหน่ง 1644 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง1537 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch และที่ตำแหน่ง 1260 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch

5.2.1 ลักษณะของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้

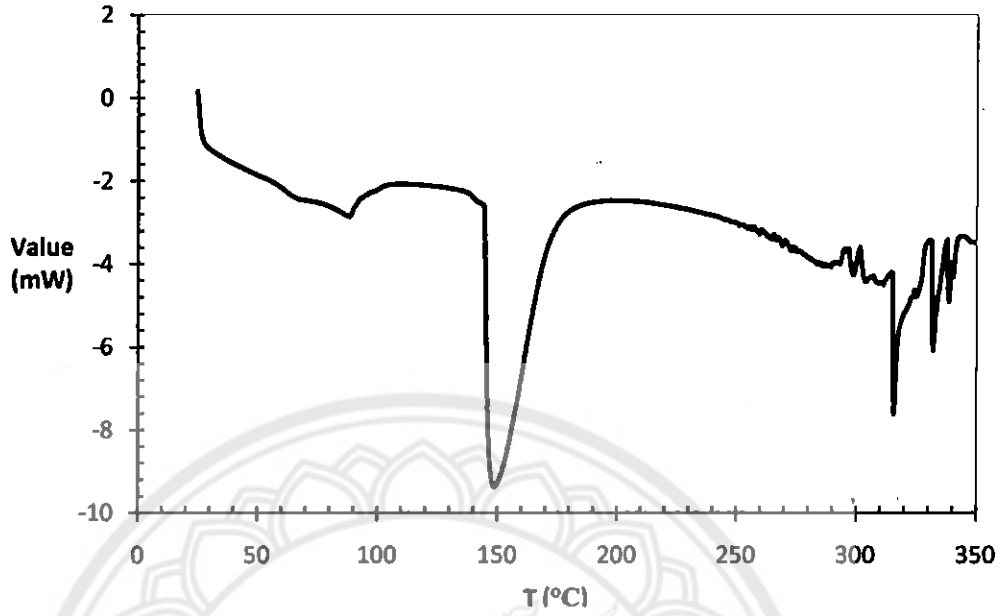


รูปที่ 5.4 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้

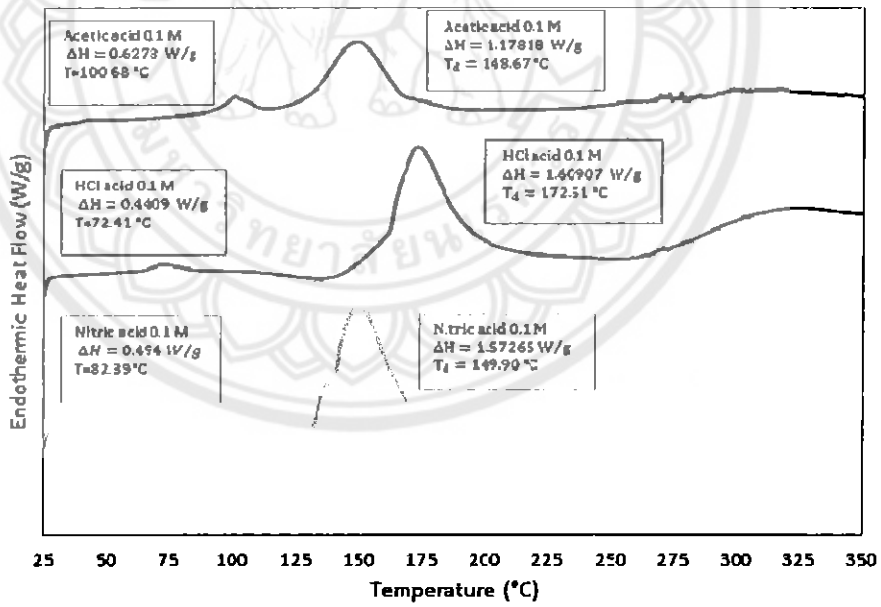
จากรูปที่ 5.4 แสดงผลการวิเคราะห์ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดปลากะพงโดยใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่าของสเปกตรัมการดูดกลืนแสดงในตำแหน่งพีคที่ช่วงคลื่น 3394 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch ที่ตำแหน่ง 2930 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันก์ของ CH_2 Asymmetrical Stretch ที่ตำแหน่ง 1648 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง 1455ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch และที่ตำแหน่ง 1081 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretchจากผลการวิเคราะห์สเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดอะซิติก พบว่าคอลลาเจนที่ได้แสดงตำแหน่งพีคของการดูดกลืนคลื่นแสงใกล้เคียงกับคอลลาเจนมาตรฐาน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดหรือกรดอะซิติกจะไม่ส่งผลต่อโครงสร้างทางเคมีของ คอลลาเจน

คอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกไม่สามารถนำมาวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนได้ เนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกมีความเป็นกรดสูงจึงทำให้คอลลาเจนที่สกัดได้เสียสภาพ จึงไม่สามารถนำไปวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีได้

5.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อน



รูปที่ 5.5 Differential Scanning Colorimeter DSC ของคอลลาเจนที่สกัดได้



รูปที่ 5.6 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยจากหนังหมู [19]

จากรูปที่ 5.5 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกโดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) จากผลการวิเคราะห์พบว่าอุณหภูมิการเสียสภาพ (T_d) เป็น 149.9 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบจากรูป 5.6 ซึ่งเป็นการสกัด

คอลลาเจนจากหนังหมู พบว่าอุณหภูมิการเสื่อมสภาพของคอลลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดปลากะพงโดยใช้กรดอะซิติกมีค่าใกล้เคียงกับที่สกัดได้จากหนังหมู จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการสกัดคอลลาเจนจากปลากะพงด้วยกรดอะซิติกไม่ส่งผลทำให้พฤติกรรมทางด้านความร้อนของคอลลาเจนเปลี่ยน ซึ่งแสดงให้พบว่าการใช้กรดอะซิติกไม่ส่งผลให้ขนาดของสมบัติโมเลกุลของคอลลาเจนที่ได้ไม่มีขนาดสั้นลงหรือเปลี่ยนแปลงไปจากธรรมชาติ

อย่างไรก็ตามคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกไม่สามารถนำมาวิเคราะห์สมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนได้ เนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกมีความเป็นกรดสูงจึงทำให้คอลลาเจนที่สกัดได้เสียสภาพ จึงไม่สามารถนำไปวิเคราะห์สมบัติทางด้านความร้อนได้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงด้วยวิธีการสกัดด้วยกรดอะซิติกและกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิช่วง 5-15 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการสกัด 12-72 ชั่วโมง อัตราส่วนของเกล็ดปลากะพงต่อสารละลายกรด 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 0.3 0.6 และ 0.9 โมลาร์ ตามลำดับ พบว่าคอลลาเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มเวลาในการสกัด การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกและไฮโดรคลอริก ทำให้ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้มีปริมาณลดลง การสกัดด้วยกรดอะซิติกให้ปริมาณคอลลาเจนสูงสุดกรดไฮโดรคลอริก การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีจากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก จะมีอุณหภูมิการเสียสภาพ (T_d) ที่ 149.9 องศาเซลเซียส

6.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลความเข้มข้นของกรดที่ส่งผลต่อปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้ สามารถสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของกรด 0.3 โมลาร์ ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มากกว่าที่ความเข้มข้นของกรด 0.6 และ 0.9 โมลาร์ ดังนั้นในการสกัดคอลลาเจนเพื่อให้ได้ปริมาณสูงควรทำการทดลองที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.3 โมลาร์

เอกสารอ้างอิง

[1] จีรพงษ์. (2555). **สาระน่ารู้เรื่องอาหารเสริม2: คอลลาเจนไฮโดรไลเซท Health Concious.** สืบค้นเมื่อ 16 สิงหาคม 2554, จาก http://www.health-concious.com.

[2] ประเสริฐ สายสิทธิ์. (2524). **ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ.** กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร.

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

[4] ศิริรัตน์ จันท์จารุณี. (2551). **เอกสารประกอบการสอนวิชาเทคนิคทางเคมีอินทรีย์.** พิษณุโลก : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

[5] นันทพร อัคนิจ. (2550). **การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกุดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[6] สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพณิชยกิจ. (2551). **ชีวโมเลกุล.** กรุงเทพฯ : บริษัท วี.พริ้น (1991) จำกัด.

[7] วิมล เหมาะจันทร. (2540). **ชีววิทยาปลา.** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[8] อัมพร ภิญโญวิทย์. (2545). **มีนวิทยา (Ichthyology).** (พิมพ์ครั้งที่ 1). จันทบุรี : โรงพิมพ์บริษัทต้นฉบับ จำกัด.

[9] สุภาพร สุกสีเหลือง. (2542). **มีนวิทยา (Ichthyology).** กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ.

[10] ตระกูล พรหมจักร. (2552). **การสกัดเจลาตินจากหนังปลาเผาะ.** เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

[11] Shanmugam, V., et, al. (2012). Extraction, structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of Sepiellainermis. **Biotechnology.,** (78), 4326-14337.

[12] Da'valos, A., M. Miguel, B. Bartolome' and R. Lo'pez-Fandiño. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **J. Food Prot.,** (67), 1939–1944.

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

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

[15] Nagai, T., M. Izumi, and M. Ishii. (2004). Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. **Int. J. Food Sci. Technol.,** (39), 239–244.

[16] S. Zeng, J. Yin, S. Yang, C. Zhang. (2012). Structure and characteristics of acid And pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (Rachycentron canadum). **Food Chemistry.,** (135), 1975–1984.

[17] Li, D., Mu Ch., Cai, S., and Lia, W., (2009). Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. **Ultrasonic Sonochemistry.,** (16), 605-609.

[18] 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.

[19] Shanmugam, V., et, al. (2012) .Extraction, structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of Sepiellainermis. **Biotechnology.,** (78), 4326-14337.

ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบและข้อมูลวิเคราะห์

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ก.1 ข้อมูลการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เกล็ดปลากะพงแห้ง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณคอลลาเจนที่ได้	
	Dried Collagen (กรัม)	%Yield
12	0.028	0.562
24	0.041	0.817
48	0.045	0.901
72	0.054	1.086

ตารางที่ ก.2 ข้อมูลการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เกล็ดปลากะพงแห้ง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณคอลลาเจนที่ได้	
	Dried Collagen (กรัม)	%Yield
12	0.052	1.036
24	0.153	3.068
48	0.199	3.98
72	0.206	4.11

ตารางที่ ก.3 ข้อมูลของการสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดที่ 24 ชั่วโมง เกล็ดปลากะพง 5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 5-15 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้น (โมลาร์)	ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้			
	กรดอะซิติก		กรดไฮโดรคลอริก	
	กรัม	ร้อยละ	กรัม	ร้อยละ
0.3	0.153	3.068	0.041	0.817
0.6	0.081	1.623	0.026	0.521
0.9	0.034	0.676	0.007	0.134