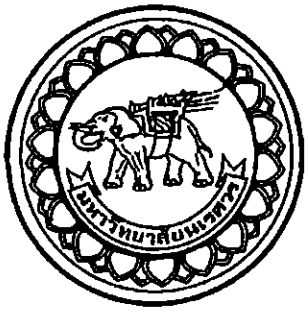


การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับกระบวนการอัดสลายแรงดันแบบช่วง

COLLAGEN EXTRACTION FROM PORCINE SKIN BY USING ENZYMATIC TREATMENT INCORPORATED WITH PERIODIC PRESSURIZED TECHNIQUE

นางสาวชลธิชา สุรรัตน์ รหัส 52364940

นายธนัชชัย ชื่นทองมอญ รหัส 52365008

ห้องสมุดคณะวิศวกรรมศาสตร์
วันที่รับ - 5 ส.ค. 2556
เลขทะเบียน 163241041
เลขเรียกหนังสือ ปร.
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2555

ใบรับรองปริญญานิพนธ์

ชื่อหัวข้อโครงงาน	การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง	
ผู้ดำเนินโครงงาน	นางสาวชลธิชา สุรรัตน์	รหัส 52364940
	นายธนัชชัย ชื่นทองมอญ	รหัส 52365008
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	การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง
ผู้ดำเนินโครงงาน	นางสาวชลธิชา สุรรัตน์ รหัส 52364940
	นายธนัชชัย ชื่นทองมอญ รหัส 52365008
ที่ปรึกษาโครงงาน	ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
ภาควิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ
ปีการศึกษา	2555

.....

บทคัดย่อ

ในโครงงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการพัฒนาวิธีการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยใช้กระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกและเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง โดยตัวแปรที่ศึกษา คือ จำนวนรอบของกระบวนการอัดคลายแรงดันและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยใช้กรดอะซิตริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 0.1% (w/v) เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันที่ 2 รอบต่อชั่วโมง ส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นทุกๆ ช่วงเวลาของการสกัดคอลลาเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดคอลลาเจนแบบการปั่นกวน เนื่องจากการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันสามารถช่วยทำให้การแทรกซึมของเอนไซม์เข้าไปในผิวหนังหมูที่มีความซับซ้อนได้มากขึ้น เมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันเป็น 4 รอบต่อชั่วโมง พบว่าการเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันไม่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ จากการศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยเทคนิค FT-IR พบว่า การประยุกต์การอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติความสามารถทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้ กล่าวได้ว่าการประยุกต์ใช้แรงกลไม่ทำลายหรือไม่ชักนำให้โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนเสียสภาพ จากการศึกษาสมบัติทางความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยเทคนิค DSC พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากการปั่นกวนมีค่าอุณหภูมิการเสียสภาพ (T_d) 147 องศาเซลเซียส ที่สกัดได้จากการอัดคลายแรงดัน 2 รอบต่อชั่วโมง 154 องศาเซลเซียส และสกัดได้จากการอัดคลายแรงดัน 4 รอบต่อชั่วโมง 150 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

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
นางสาวชลธิชา สุรรัตน์
นายธนัชชัย ชื่นทองมอญ

กุมภาพันธ์ 2556

สารบัญ

หน้า

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

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

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎี.....4
2.1 คอลลาเจนและองค์ประกอบของคอลลาเจน.....5
2.2 โครงสร้างคอลลาเจน.....5
2.3 ชนิดคอลลาเจน.....6
2.4 การสกัด (Extraction).....8
2.5 กระบวนการเตรียมคอลลาเจน.....10
2.6 เทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง.....12
2.7 การประยุกต์ใช้คอลลาเจน.....14

บทที่ 3 วิธีดำเนินโครงงาน.....18

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์.....21
4.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....21
4.2 วิธีการทดลอง.....22
4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติ.....24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 ผลการทดลองและการวิเคราะห์.....25
5.1 ผลของสภาวะการสกัดคอลลาเจนที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้.....25
5.2 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน.....27
5.3 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของคอลลาเจน.....30

บทที่ 6 บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....31
6.1 บทสรุป.....31
6.2 ข้อเสนอแนะ.....31

เอกสารอ้างอิง.....32

ภาคผนวก ก.....34

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินงาน....3

2.1 องค์ประกอบกรดอะมิโนของคอลลาเจนจากหนังของวัว (Bovine) หมู (Porcine) และปลาตาหวาน (Bigeye Snapper)....5

2.2 ชนิดของคอลลาเจน หน่วยย่อย และตำแหน่งที่พบ....7

2.3 แสดงอุณหภูมิจุดสมดุลสถานะ (Triple Point) 13

5.1 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน....27

5.2 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของกรดอะซิตริกมาตรฐาน....29

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของคอลลาเจน....6

2.2 การตัดพันธะส่วนปลายของโทรโปคอลลาเจนโดนเอนไซม์เปปซิน....11

2.3 แผนภาพ Phase Diagram....12

4.1 แผนผังกระบวนการในการสกัดคอลลาเจน....22

4.2 กระบวนการอัดคลายแรงดันแบบช่วง....23

4.3 คอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากการทำแห้ง....24

5.1 ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้....25

5.2 ฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟาเรดสเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน....27

5.3 FT-IR Spectra ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยสารละลายกรดร่วมกับเอมไซม์เปปซินโดยวิธี (a) ปั่นกวน (b) อัดคลายแรงดัน 1 ชั่วโมง 2 รอบ และ (c) อัดคลายแรงดัน 4 รอบต่อชั่วโมง....28

5.4 กราฟ DSC แสดงถึงอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพ....30

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissues) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีอยู่ประมาณร้อยละ 30 ของส่วนที่เป็นโปรตีนทั้งหมดในร่างกาย โดยทั่วไปแล้วคอลลาเจนที่พบจะเป็นองค์ประกอบหลักของ ผิวหนัง กระดูก เอ็น และกระดูกอ่อน คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใย เกิดจากการรวมกันของกรดอะมิโนและมีการจัดเรียงตัวกัน โดยมีพันธะต่างๆ ทำให้โครงสร้างของ คอลลาเจนแข็งแรง คงรูปร่างได้ [1] ในปัจจุบันได้มีการนำคอลลาเจนมาใช้งานกันอย่างแพร่หลาย อาทิ ใช้งานด้านอุตสาหกรรม ยา เครื่องสำอางค์ และการประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์

การนำคอลลาเจนมาใช้งานทางด้านการแพทย์ จะอยู่ในรูปแบบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering Technology) อาทิ ผิวหนังสังเคราะห์ (Artificial Skin) และกระดูกเทียม (Artificial Bone) โดยขึ้นรูปจากคอลลาเจน จากรายงานของ U.Hempel และคณะ [2] ซึ่งได้ศึกษาการสร้างโครงสร้างภายนอกเซลล์ (Extracellular Matrices) จากคอลลาเจน เพื่อใช้ทางการแพทย์กระดูก จากการศึกษาพบว่า คอลลาเจนสามารถนำมาสร้างโครงสร้างภายนอกเซลล์ เพื่อใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อในการสร้างกระดูกเทียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันกระบวนการสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปนิยมใช้กรดและเอนไซม์ในกระบวนการสกัดด้วยสารละลายกรด (Acid Soluble Collagen) อาทิเช่น กรดอะซิติก โครงสร้างของคอลลาเจนจะเกิดการพองตัวและพันธะระหว่างโมเลกุลจะจับตัวกันแบบหลวมๆ ทำให้สามารถสกัดคอลลาเจนได้ [3] อย่างไรก็ตามข้อเสียของกระบวนการใช้กรด คือ เกิดการปนเปื้อนของสารเคมี ซึ่งส่งผลต่อสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของคอลลาเจน ในกระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์ (Enzyme Soluble Collagen) อาทิ เปปซิน เป็นกระบวนการการสกัดที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากเอนไซม์เปปซินมีความจำเพาะในการตัดพันธะตำแหน่งที่โลเปปไทด์ออก ซึ่งทำให้ไม่เกิดอาการแพ้เมื่อนำไปใช้งานกับร่างกาย และในกระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์ร่วมกับกรด อาทิเช่น กรดอะซิติกร่วมกับเอนไซม์เปปซิน เป็นกระบวนการสกัดที่ทำให้ได้คอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าการสกัดด้วยกรดเพียงอย่างเดียวและเอนไซม์ยังมีความจำเพาะในการตัดพันธะจึงทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่ได้มากกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามกระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยกรด เอนไซม์ และเอนไซม์ร่วมกับกรดยังมีข้อเสีย คือ ให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ต่ำ

การประยุกต์ใช้แรงกลร่วมกับเอนไซม์หรือกรดเป็นเทคนิคที่มีรายงานว่าสามารถเพิ่มปริมาณการสกัดคอลลาเจนได้ [4] เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง เป็นเทคนิคทางกลเทคนิคหนึ่งที่

สามารถนำมาประยุกต์ใช้งานร่วมกับเอนไซม์ได้ จากรายงานของ I.Prasertsung และคณะ [5] ซึ่งได้ศึกษาการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมู ในกระบวนการเตรียมดังกล่าวได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับเอนไซม์ในการกำจัดเซลล์ออกจากผิวหนังของหมูที่มีความซับซ้อน จากการศึกษาพบว่า การประยุกต์ใช้เทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์ออกจากโครงสร้างของหนังหมูได้สูงขึ้นเนื่องจากการเพิ่มแรงดันสามารถช่วยทำให้เอนไซม์สามารถแทรกซึมเข้าไปในหนังหมูได้ดี ขึ้นส่งผลให้เซลล์ถูกกำจัดได้มากขึ้น

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการพัฒนาวิธีการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยใช้กระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกและเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง โดยตัวแปรที่ศึกษา คือ จำนวนรอบของกระบวนการอัดคลายแรงดัน และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

เพื่อศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกและเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique)

1.3 ขอบเขตในการดำเนินโครงงาน

1.3.1 ตัวแปรต้น

1.3.1.1 จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันแบบช่วงโดยศึกษาในช่วงทุก 15 นาที และ 30 นาที

1.3.1.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน

1.3.2 ตัวแปรควบคุม

1.3.2.1 อุณหภูมิของสารละลาย 4-10 องศาเซลเซียส

1.3.2.2 อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของเอนไซม์เปปซินต่อสารละลายที่ 1:10

1.3.2.3 อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของหนังหมูต่อสารละลายที่ 1:15

1.3.2.4 ความดันภายในถังอัดคลายแรงดัน 4 บาร์

1.3.2.5 หนังหมูสดจากหมูช่วงอายุ 3-6 เดือน

1.4 สถานที่ในการดำเนินโครงงาน

ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน

ตั้งแต่เดือน 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
หลักการและทฤษฎี

2.1 คอลลาเจนและองค์ประกอบของคอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนโครงสร้างหลักที่ส่วนใหญ่พบในร่างกายสัตว์ พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissues) โดยมีอยู่ประมาณร้อยละ 30 ของส่วนที่เป็นโปรตีนทั้งหมดในร่างกายสัตว์ โดยจะพบคอลลาเจนในส่วนต่างๆ ของร่ายกาย ได้แก่ ผิวหนัง กระดูก เอ็น และกระดูกอ่อน ซึ่งคอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใยเกิดจากการรวมกันของกรดอะมิโน จะทำให้เซลล์ต่างๆ มีการจัดเรียงตัวกันที่มีความจำเพาะ โดยมีพันธะต่างๆ ทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนแข็งแรงคงรูปร่างได้ คอลลาเจนเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีอยู่ในร่างกายสัตว์สูงที่สุดมีลักษณะเป็นเส้นเล็กๆ ยาวและหยิกซึ่งจะอยู่เป็นเส้นเดี่ยวหรือหลายเส้นก็ได้ คอลลาเจนมีสีขาวและมีความยืดหยุ่นต่ำ ส่วนประกอบสำคัญของคอลลาเจน คือ ไกลโคลโปรตีนซึ่งมีปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคสปนอยู่ด้วยเล็กน้อย ซึ่งมีกรดอะมิโนไกลซีนในปริมาณมากที่สุดโดยมีประมาณหนึ่งในสามของปริมาณของกรดอะมิโนทั้งหมดในคอลลาเจน [6] องค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจนจะส่งผลต่อสมบัติทางเคมีและกายภาพของคอลลาเจน เช่น สมบัติการละลาย ความสามารถในการเกิดพันธะ และความคงตัวต่อความร้อน สัตว์แต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ดังสรุปไว้ในตารางที่ 2 คอลลาเจนจากหนังสัตว์น้ำ อาทิเช่น ปลาตาหวาน มีปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนต่ำกว่าคอลลาเจนจากหนังสัตว์บก (วัวและสุกร) ซึ่งปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีนจะมีความสัมพันธ์กับความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน เนื่องจากไฮดรอกซี โพรลีนจะช่วยให้โครงสร้างของโทรโปรคอลลาเจนมีความคงตัวมากขึ้น ดังนั้นคอลลาเจนที่ได้จากสัตว์บกจะมีความคงตัวต่อความร้อนสูงกว่าคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ ปริมาณกรดอะมิโนชนิดไทโรซีนของคอลลาเจนจากสัตว์ทุกชนิดมีปริมาณที่ต่ำมากซึ่งปริมาณของไทโรซีนบ่งชี้ถึงปริมาณที่โลเปปไทด์ [7]

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบ่งออกเป็นส่วนย่อยได้หลายชนิดด้วยกัน คือ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันสมบูรณ์ (Connective Tissue Proper) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันพิเศษ (Specialized Connective Tissue) ซึ่งได้แก่ กระดูกและกระดูกอ่อน กระดูกประกอบด้วยเซลล์ Fibrous Elements และ Ground Substance ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่เหมือนกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แต่จะแตกต่างกันตรงที่ Ground Substance ของกระดูกจะเป็นแคลเซียมเกือบทั้งหมด จึงทำให้กระดูกมีลักษณะเป็นของแข็งสามารถเสริมสร้างกันเองขึ้นเป็นโครงร่างของร่างกาย ตลอดจนเป็นหลักให้กล้ามเนื้อและเอ็นสามารถยึดติดเข้าด้วยกันจนเป็นรูปร่างของสัตว์ สำหรับกระดูกอ่อนมีส่วนประกอบคล้ายๆ กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน คือ มีเซลล์และไฟเบอร์รวมตัวกันอยู่ภายใน Ground Substance ซึ่งเป็น Non-Cellular Elements หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เมตริกซ์ (Matrix) ซึ่งมีสภาพเป็นกึ่งแข็งกึ่งอ่อน กระดูกอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดพิเศษที่สามารถแบ่งออกได้หลายชนิดตามปริมาณคอลลาเจนและอิลาสติน กระดูกอ่อน

ที่พบมากจะเป็นกระดูกอ่อนที่มีลักษณะคล้ายกระจกพบบริเวณปลายของกระดูกที่ต่อเข้ากันตามข้อต่อต่างๆ ซึ่งคอลลาเจนจะมีความสำคัญในการเชื่อเข้ากับกระดูกที่พบในช่องระหว่างข้อของกระดูกสันหลัง [1]

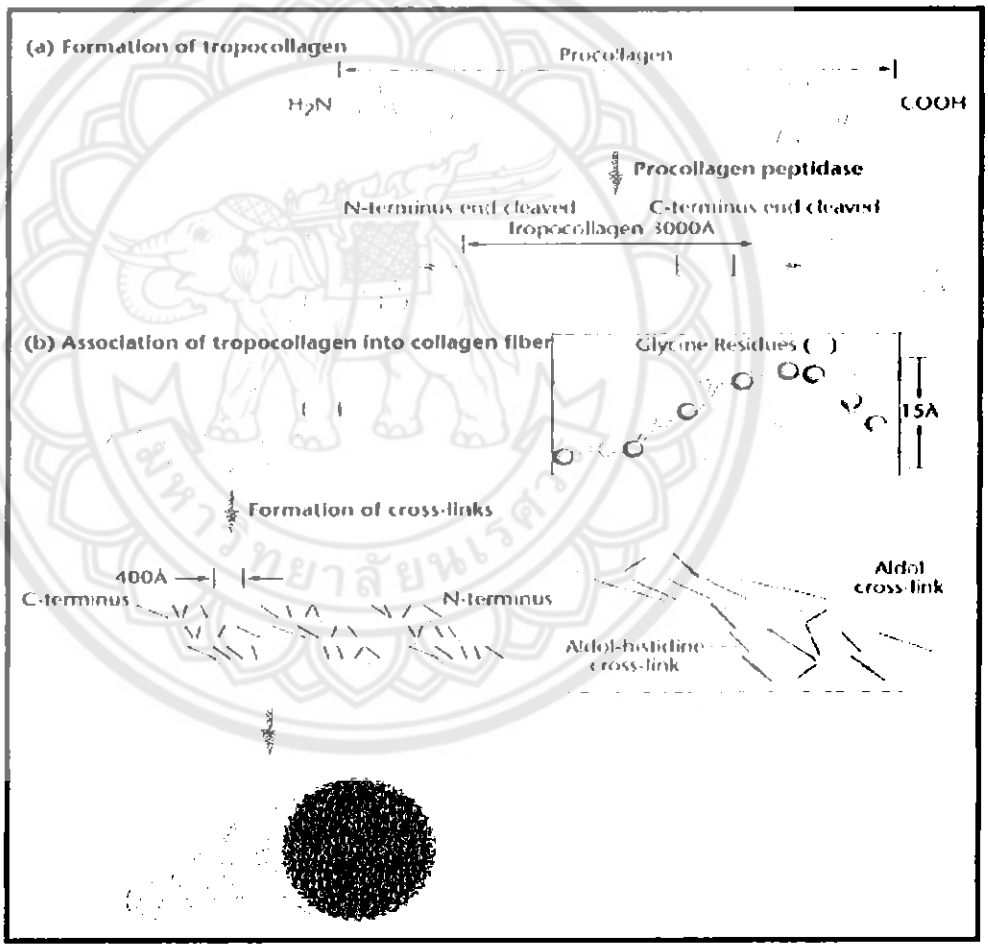
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบกรดอะมิโนของคอลลาเจนจากหนังของวัว (Bovine) หมู (Porcine) และปลาตาหวาน (Bigeye Snapper) (Residues/1000 Residues) Amino Acid [8]

กรดอะมิโน	ปริมาณ (g) /1,000 g		
	หนังวัว	หนังหมู	ปลาตาหวาน
Aspartic acid	40.3	34.6	51
Hydroxyproline	129.1	125.4	77
Threonine	10.9	12.0	29
Serine	2.4	2.0	36
Glutamic acid	18.4	9.9	78
Proline	49.8	52.0	116
Glycine	411.8	396.8	286
Alanine	146.6	153.5	136
Valine	17.1	20.6	22
Methionine	12.1	10.2	12
Isoleucine	26.8	27.8	5
Leucine	37.1	42.8	24
Tyrosine	2.7	4.2	4
Phenylalanine	11.7	13.4	15
Hydroxylysine	-	-	10
Lysine	55.2	63.6	31
Histidine	10.1	12.8	10
Arginin	26.1	26.9	60

2.2 โครงสร้างคอลลาเจน

คอลลาเจนมีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นใย (Fibrous Protein) ซึ่งลักษณะที่เป็นเส้นใยนี้จะเกิดจากการเรียงตัวกันของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคอลลาเจน โดยมีพันธะต่างๆ ทำหน้าที่ยึดเหนี่ยวให้โครงสร้างของคอลลาเจนมีความคงตัวและแข็งแรง โดยทั่วไปส่วนประกอบของคอลลาเจนจะเป็นกรดอะมิโนชนิดไกลซีน (Glycine) ประมาณหนึ่งในสามของกรดอะมิโนทั้งหมด มีกรดอิมิโน (Imino Acid) ประมาณหนึ่งในสี่ โดยจะแยกเป็นโปรลีน (Proline) ร้อยละ 12 และไฮดรอกซีโปรีลีน (Hydroxyproline) ร้อยละ 11 ลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนจะมีลักษณะ $(\text{-Gly-X-Hydro-})_m$ หรือ $(\text{-Gly-X-Pro-})_m$ โดยที่ X จะเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ระหว่างกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีพันธะเปปไทด์เชื่อมอยู่เพื่อประกอบเป็นสายโปลีเปปไทด์ สายโพลีเปปไทด์จะมีการบิดเป็นเกลียวงวนซ้าย (Left Handed Helix) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมอยู่ระหว่างกรดอิมิโน (Imino Acid) เพื่อทำ

ให้โครงสร้างที่เป็นเกลียวเกิดความคงตัว ดังนั้นคอลลาเจนที่มีกรดอิมิโน (Imino Acid) เป็นจำนวนมากก็จะทำให้โครงสร้างคอลลาเจนมีความแข็งแรงคงตัวมากขึ้นด้วย หลังจากนั้นสายโปลีเปปไทด์ 3 สายจะพันรอบกันเองเป็นเกลียววนขวาขนาดใหญ่ (Right Handed Helix) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายโปลีเปปไทด์แต่ละสาย ซึ่งสายโปลีเปปไทด์ 3 สายที่มารวมกันเป็นเกลียว เรียกว่า โทรโปคอลลาเจน (Tropocollagen) ซึ่งการที่โครงสร้างของคอลลาเจนมีความแข็งแรง มีความคงตัวสูงและทำให้เกิดการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ได้ยาก เช่น การทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำ ดังนั้นคอลลาเจนจึงไม่สามารถละลายน้ำได้ หลังจากนั้นโทรโปรคอลลาเจนจะเรียงขนานกันโดยมีแรงแวนเดอร์วาลส์และพันธะไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) เชื่อมระหว่างโทรโปคอลลาเจน ทำให้เกิดลักษณะโครงสร้างที่เป็นเส้นใยของคอลลาเจนดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของคอลลาเจน [9]

2.3 ชนิดของคอลลาเจน

ปัจจุบันสามารถแบ่งคอลลาเจนออกเป็น 25 ชนิดโดยแบ่งตามลำดับของกรดอะมิโนมวลโมเลกุลส่วนประกอบของหน่วยย่อย (Subunit) ความยาวของสายฮีลิกซ์ คุณสมบัติและขนาดของส่วนที่ไม่เป็นฮีลิกซ์ (Non-Helix Portion) ดังแสดงในตารางที่ 3

คอลลาเจน Type I พบได้เป็นส่วนใหญ่ในสัตว์ชั้นสูง ในส่วนของหนัง เอ็น และกระดูก ซึ่งประกอบด้วย 3 สาย ได้แก่ สาย $\alpha 1(I)$ จำนวน 2 สาย $\alpha 2(I)$ จำนวน 1 สาย ซึ่งสาย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ จะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้อาจพบสาย $\alpha 1(I)$ จำนวน 3 สาย ซึ่งพบได้น้อยมาก

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

คอลลาเจน Type III พบได้ปริมาณน้อย ส่วนใหญ่พบในเส้นเลือด

คอลลาเจน type IV มีความจำเพาะเจาะจงมาก ซึ่งพบได้เฉพาะใน Loose Fibrillar Network (ร่างแหของเส้นใยฝอยที่เกาะกันหลวมๆ) ใน Basement Membrane (เยื่อแผ่นบางๆ ที่อยู่นอกเซลล์) ส่วนคอลลาเจน Type อื่นๆ พบปริมาณเล็กน้อย

ตารางที่ 2.2 ชนิดของคอลลาเจน หน่วยย่อย และตำแหน่งที่พบ [8]

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	$\alpha 1(V)\ \alpha 2(V)(3(V)$ 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
XIV	Unknown	Same as Type I

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ชนิดของคอลลาเจน หน่วยย่อย และตำแหน่งที่พบ [8]

Collagen type	Chain composition	Tissue distribution
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 การสกัด (Extraction)

การสกัดเป็นเทคนิคที่สำคัญในการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายแยกเอาสารผสมออกจากกันโดยอาศัยความสามารถในการละลายเฉพาะตัวของสารในตัวทำละลายที่ใช้สารผสมนั้นอาจเป็นสารผสมที่ได้จากปฏิกิริยาเคมีหรือเป็นสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ

2.4.1 ประเภทของการสกัด

2.4.1.1 การสกัดอย่างง่าย (Simple Extraction)

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

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

2.4.1.2 การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous Extraction)

ก. Light-Solvent Extraction โดยเทคนิคนี้เหมาะสำหรับการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่เบากว่าน้ำ

ข. Heavy-Solvent Extraction โดยเทคนิคนี้เหมาะสำหรับการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่หนักกว่าน้ำ

ค. Soxhlet Extraction Apparatus โดยเทคนิคนี้จะเหมาะสมสำหรับแยกสารอินทรีย์ที่ไม่เสถียรที่ความร้อนสูงออกจากสารผสมที่เป็นของแข็ง

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด

2.4.2.1 การแพร่ (Diffusion)

การแพร่เป็นการเคลื่อนย้ายโมเลกุลต่าง ๆ ของสารประกอบชนิดหนึ่งผ่านส่วนที่ต่อเนื่อง (Continuum) ในเฟสหนึ่งหรือผ่านผิว (Interface) ระหว่างเฟส ในการสกัดของแข็งของเหลว ตัวทำละลายจะต้องแพร่เข้าไปในของแข็งเพื่อละลายตัวถูกละลายออกมา และตัวถูกละลายก็ต้องแพร่ออกมาจากของแข็งที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายไปยังเฟสของตัวทำละลาย อัตราการแพร่หาได้จากระยะเวลาที่ต้องการให้สมดุลเกิดขึ้นระหว่างเฟสทั้งสองซึ่งเวลาที่ต้องการสำหรับกระบวนการแพร่เพื่อให้ถึงสมดุลเป็นสัดส่วนกลับกับกำลังสองของระยะทางการแพร่ ดังนั้นในการสกัดด้วยตัวทำละลาย ยิ่งอนุภาคมีขนาดเล็ก ระยะเวลา (Residence Time) ที่ของแข็งต้องอยู่ในขั้นของการสกัดยิ่งสั้น แม้ว่าขนาดของอนุภาคของของแข็งจะมีผลต่ออัตราการสกัด คือ ยิ่งอนุภาคมีขนาดเล็ก พื้นที่ผิวสัมผัส (Interfacial Area) ระหว่างของแข็งและของเหลวยิ่งมาก ทำให้อัตราการถ่ายเทขององค์ประกอบที่ละลายได้เพิ่มมากขึ้นก็ตาม แต่ในกรณีที่สารเป็นอนุภาคละเอียดมาก อาจก่อให้เกิดความต้านทานหรือยับยั้งการหมุนเวียนของตัวทำละลายที่จะผ่านชั้นของของแข็ง ทำให้พื้นที่ผิวของการสัมผัสที่มากขึ้นก็ไม่ได้ช่วยในเรื่องอัตราการถ่ายเทมวล

2.4.2.2 ความสามารถในการละลาย (Solubility)

ความเข้มข้นของตัวถูกสารละลายสูงสุดที่เป็นไปได้ในเอกซ์แทรคท์สุดท้ายที่ออกจากระบบการสกัด คือ ความเข้มข้นอิ่มตัว ดังนั้นอัตราส่วนของ (ตัวทำละลาย/ของแข็ง) ต้องสูงพอที่เมื่อตัวทำละลายบริสุทธิ์สัมผัสของแข็งที่ส่งเข้าสู่เครื่องสกัดในตอนต้น สารละลายที่ได้หลังสมดุลต้องมีความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นอิ่มตัวของตัวถูกละลาย ในระบบที่ต้องทำการสกัดของแข็งหลายครั้งด้วยตัวทำละลายที่หมุนเวียนกลับมาใช้ (เช่น ในกรณีของการสกัดด้วยของไหลที่อยู่เหนือจุดวิกฤติ) ถ้าความสามารถในการละลายของตัวทำละลายสูงจะช่วยลดจำนวนเที่ยวของการหมุนเวียนตัวทำละลายที่ต้องใช้เพื่อกำจัดตัวถูกละลายออกไปในระดับที่ต้องการ ซึ่งของเหลวที่ใช้เป็นตัวทำละลายควรจะมีความหนืดต่ำเพื่อให้เกิดการหมุนเวียนได้ดีโดยทั่วไป มักจะใช้ตัวทำละลายค่อนข้างบริสุทธิ์ในช่วงแรก แต่ขณะที่กระบวนการสกัดดำเนินต่อไป ความเข้มข้นของตัวถูกละลายจะเพิ่มขึ้นและอัตราการสกัดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของความเข้มข้นลดลงและสารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้น ในหลายกรณี อุณหภูมิมีผลต่ออัตราการสกัด เนื่องจากความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการสกัดจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นซึ่งทำให้อัตราการสกัดสูงขึ้น นอกจากนั้นสัมประสิทธิ์ของการแพร่มักจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้อัตราการแลกเปลี่ยนดีขึ้นด้วย ส่วนการกวนมีความสำคัญในการช่วยเพิ่มค่าสัมประสิทธิ์การแพร่แบบเอ็ดดี้ (Eddy Diffusivity) และเพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลจากผิวของอนุภาคไปยังสารละลายส่วนใหญ่

2.4.2.3 สมดุล (Equilibrium)

เมื่ออัตราส่วนของตัวทำละลายต่อของแข็ง มากพอที่จะทำให้ระดับของตัวถูก-ละลายที่ต้องการละลายออกมา สมดุลที่เกิดขึ้นจะเป็นสภาวะที่ความเข้มข้นของตัวถูกละลาย ในเฟสของของแข็งและเฟสของตัวทำละลายเท่ากัน ดังนั้นความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลายที่อยู่ในของแข็งจะเท่ากับในเฟสของของเหลวหรือตัวทำละลาย แต่เมื่อปริมาณของตัวทำละลายไม่เพียงพอต่อการละลายตัวถูกละลายทั้งหมดที่มีอยู่ สมดุลจะพิจารณาว่าเป็นสภาวะที่ความเข้มข้นของตัวถูกละลายไม่มีการเปลี่ยนแปลงอีกต่อไปในทั้งสองเฟสไม่ว่าจะมีการสัมผัสที่นานขึ้นก็ตาม อย่างไรก็ตาม เพื่อให้สมดุลเกิดขึ้นจำเป็นต้องให้เฟสของแข็งและตัวทำละลายได้สัมผัสกันเป็นเวลาที่นานพอ ปริมาณที่บ่งบอกความเข้มข้นสมดุลของตัวถูกละลายในเฟสตัวทำละลายในขั้นของการสกัดขั้นหนึ่งๆ เรียกว่า ประสิทธิภาพของขั้น (Stage Efficiency) ถ้าสมดุลเกิดขึ้นในขั้นการสกัดขั้นหนึ่งๆ ขั้นนั้นจะมีประสิทธิภาพเป็นร้อยละ 100 และเรียกว่าขั้นจินตภาพ (Ideal Stage)

2.5 กระบวนการสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการล้างทำความสะอาดวัตถุดิบก่อน แล้วจะกำจัดส่วนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออก เช่น ไขมันและโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน จากนั้นจึงนำไปทำการสกัดคอลลาเจนโดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

2.5.1 การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรด (Acid Soluble Collagen)

การสกัดคอลลาเจนที่สามารถละลายในสารละลายกรดส่วนมากจะใช้กรดอะซิติกซึ่งกรดจะมีประสิทธิภาพ ในการสกัดคอลลาเจนได้มากกว่าการใช้สารละลายเกลือ ซึ่งจะทำให้พันธะระหว่างโมเลกุลจะแตกตัว โดยกรดแล้วทำให้ประจุบนโทโปคอลลาเจนผลักกันจึงทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัวขึ้นจึงทำให้คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรดส่วนมากจะเป็นคอลลาเจนชนิด type I ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการไฮโดรไลซิส คือ กระบวนการที่เป็นปฏิกิริยาที่มีน้ำเข้าไปทำปฏิกิริยาทำให้สารตั้งต้นหลุดออกไฮโดรไลซีสของเกลือ หมายถึง ปฏิกิริยาระหว่างเกลือกับน้ำ เกลือเป็นอิเล็กโทรไลต์แก่ เมื่อเกลือละลายในน้ำ เกลือจะแตกตัวออกเป็นไอออนบวกและไอออนลบทั้งหมด ดังนั้นสมบัติของสารละลายของเกลือ จึงขึ้นอยู่กับไอออนบวกและไอออนลบในสารละลาย ไอออนบางตัวสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับน้ำและให้ H^+ หรือ OH^- จึงเรียกปฏิกิริยานี้ว่า ไฮโดรไลซีส สำหรับไอออนบวก เช่น $NH4^+$ (aq) เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ จะเขียนสมการได้ดังนี้

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

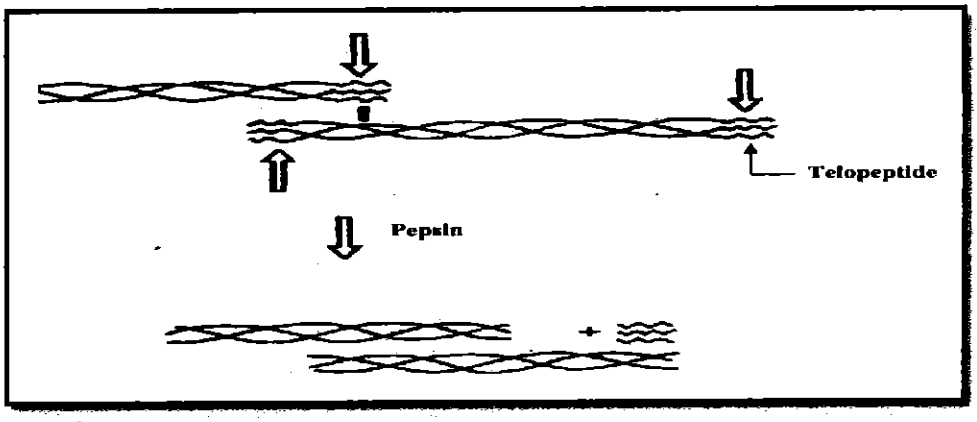
จะเห็นว่าจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไอออนบวก NH_4^+ (aq) ที่เกิดขึ้น NH_4^+ จะให้โปรตอนกับ H_2O (l) แล้วได้ H_3O^+ (aq) ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงมีสมบัติเป็นกรด สำหรับไอออนลบ เช่น $CH3COO^-$ เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ จะเขียนสมการ

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

จะเห็นว่าจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไอออนลบ CH_3COO^- ที่เกิดขึ้น CH_3COO^- (aq) จะรับ H^+ จากน้ำแล้วได้ OH^- (aq) ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงมีสมบัติเป็นเบส จึงสรุปได้ว่า "ถ้าไอออนลบของเกลือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสจะทำให้สารละลายแสดงสมบัติความเป็นเบส และถ้าไอออนบวกของเกลือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส จะทำให้สารละลายแสดงสมบัติความเป็นกรด" [10]

2.5.2 การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์ (Enzyme Soluble Collagen)

การสกัดคอลลาเจนโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้โครงสร้างโมเลกุลของคอลลาเจนที่ยังคงมีบริเวณส่วนที่เป็นทีโลเปปไทด์ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่บิดรวมตัวกันเป็นเกลียว ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการแพ้เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันปัญหาจึงนำเอนไซม์มาใช้ในการสกัดเพื่อช่วยในการกำจัดส่วนทีโลเปปไทด์ ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ คือ เอนไซม์เปปซิน เนื่องจากมีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยในช่วงที่ pH 2 ซึ่งเป็นช่วงที่ใกล้เคียงกับ pH ที่ใช้ในการสกัดด้วยกรด โดยเอนไซม์เปปซินจะสามารถทำงานได้ดีที่ pH ต่ำๆ ถึงจะมีประสิทธิภาพในการสกัดคอลลาเจนจึงทำให้เส้นใยคอลลาเจนพองตัวขึ้นทำให้ส่วนของทีโลเปปไทด์ถูกกำจัดได้ง่ายขึ้น โดยเปปซินจะมีความจำเพาะในการตัดพันธะที่ส่วนปลายของโทโปคอลลาเจนทั้งปลาย N- และ C- ออกหรือส่วนทีโลเปปไทด์ออก ซึ่งเป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Amino Acid) ค่อนข้างสูงทำให้ได้ส่วนของเปปไทด์เล็กๆ ละลายอยู่และส่วนทีโลเปปไทด์จะถูกกำจัดออก ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งมีผลดีในการตัดส่วนนั้นออกเพราะส่วนดังกล่าวจะทำให้เกิดอาการแพ้ได้ เมื่อนำไปใช้ทางการแพทย์

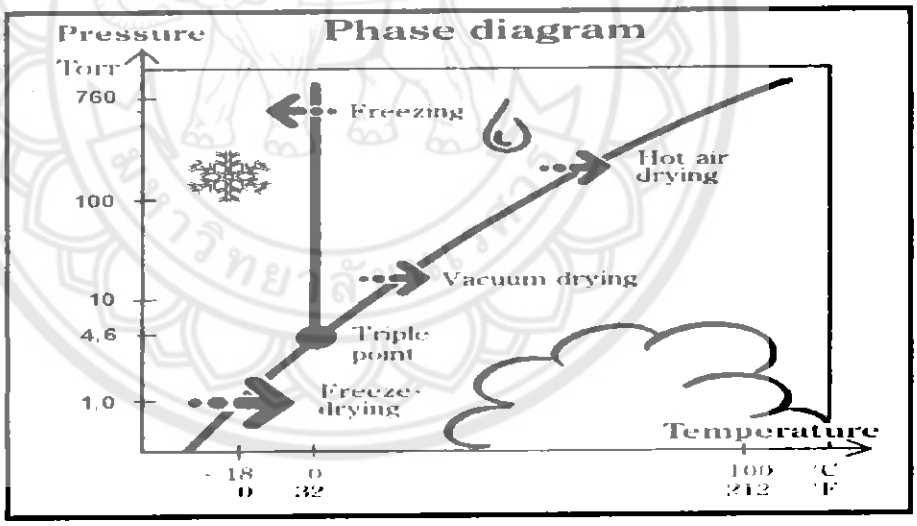


รูปที่ 2.2 แสดงการตัดพันธะส่วนปลายของโทรโปคอลลาเจนโดยเอนไซม์เปปซิน [8]

2.6 เทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง

เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) เป็นเทคนิคการทำสารให้เข้มข้นและทำให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายในลักษณะแห้ง โดยอาศัยหลักการแช่แข็ง (Freezing) เพื่อเปลี่ยนสถานะของตัวอย่างจากสถานะของเหลวมาเป็นของแข็ง จากนั้นจึงกระตุ้นให้เกิดการระเหิดของน้ำกลายเป็นไอโดยตรง โดยอาศัยหลักการปรับความดันไอของน้ำให้มีค่าลดต่ำลงกว่าจุด Triple Point ของน้ำทำให้สามารถลดปริมาณน้ำในตัวอย่างลงได้จนกระทั่งอยู่ในระดับที่สามารถเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ได้นานโดยที่มีการเสื่อมคุณภาพน้อยที่สุด โดยทั่วไปสารที่นิยมใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง นิยมใช้กับสารที่มีการสลายตัวด้วยความร้อนได้ง่ายทำให้ไม่สามารถใช้การอบแห้งหรือการทำแห้งโดยวิธีการนำหรือพาความร้อนได้โดยตรง เช่น เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ และฮอร์โมนต่างๆ เป็นต้น

การทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dehydration) หมายถึง การทำแห้ง (Dehydration) ด้วยการการเยือกแข็ง (Freezing) ให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อน แล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิด (Sublimation) เป็นไอด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำ (ที่อุณหภูมิ เท่ากับหรือต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส น้ำแข็งระเหิดที่ความดันเท่ากับ 4.7 มิลลิเมตรปรอทหรือต่ำกว่า) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2.3 แผนภาพ Phase Diagram [3]

2.6.1 ขั้นตอนการทำแห้งเยือกแข็ง

ขั้นตอนเบื้องต้นสำหรับวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง คือ เริ่มจากการเตรียมวัตถุดิบให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการหลักซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

2.6.1.1 การแช่เยือกแข็ง (Freezing) โดยเป็นการลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Freezing point) เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice Crystal Formation) อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง (Freezing Rate) ควรเป็นการแช่แข็งแบบเร็ว เพื่อให้เกิดผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก การแช่เยือกแข็ง

แบบเร็ว ที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่เยือกแข็งแบบลมเย็นเป่า (Air Blast Freezing) การแช่เยือกแข็งแบบไครโอเจน (Cryogenic Freezing) และการแช่เยือกแข็งชนิดแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด (Immersion Freezing) เป็นต้น

2.6.1.2 การระเหิด (Sublimation หรือ Primary Drying) หลังจากการแช่แข็งจนกระทั่งได้ลักษณะตัวอย่างเป็นผลึกน้ำแข็งแล้ว ในสถานะของแข็งนี้พบว่า ค่าความดันไอของน้ำมีค่าลดลงจนกระทั่งต่ำกว่าจุดสมดุลสถานะ (Triple Point) ทำให้ลักษณะการเปลี่ยนแปลงบนเส้นสมดุลสถานะเกิดขึ้นได้เพียงสองสถานะ คือ จากสถานะของแข็งสามารถเปลี่ยนสถานะเป็นไอน้ำได้โดยตรงโดยไม่ต้องเกิดการหลอมตัวเป็นของเหลวก่อน เรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า การระเหิด ซึ่งต้องอาศัยพลังงานจากภายนอกสูงถึง 2800 กิโลจูลต่อกิโลกรัมของน้ำ โดยพลังงานดังกล่าวเป็นตัวพา (Convection) ความร้อนเข้าสู่ชั้นของสารแช่แข็ง เพื่อระเหิดน้ำในรูปอิสระออกมาจากโครงผลึกสารตัวอย่าง แหล่งพลังงานข้างต้นสามารถกระทำ ได้โดยการใช้ปั๊มสูญญากาศเป็นตัวกำเนิดพลังงาน โดยอาศัยผลต่างของความดันในสารตัวอย่างกับภายในเครื่องมือเป็นตัวพาไอน้ำออกมาความแตกต่างของความดันดังกล่าวต้องสูงกว่า 10^{-2} มิลลิบาร์ หรืออาจกล่าวได้ว่าเมื่อทำการปรับสภาพความดันไอของน้ำให้ต่ำกว่า 6 มิลลิบาร์ (4.6 มิลลิเมตรปรอท) ทำให้น้ำเข้าสู่จุดสมดุลสถานะ (Triple Point)

2.6.1.3 การทำแห้งขั้นที่สอง (Secondary Drying) เมื่อการทำแห้งขั้นต้นเสร็จสมบูรณ์ น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นหลงเหลืออยู่ จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออกถึงระดับความชื้นที่ปลอดภัยสำหรับการเก็บรักษา

ตารางที่ 2.3 แสดงอุณหภูมิจุดสมดุลสถานะ (Triple Point) [19]

Substance	T [K]	p [kPa]
Acetic acid	289.8	1.27
Acetylene	192.4	120
Butane	134.6	7×10^{-4}
Chloroform	175.43	0.870
Iodine	386.65	12.07
Nitric oxide	109.50	21.92
Nitrogen	182.34	12.6
Oxygen	54.3584	0.152
Sulfur dioxide	197.64	1.67
Titanium	1941	5.3×10^{-3}
Water	273.16	0.61

2.6.2 การประยุกต์การทำแห้งเยือกแข็ง

2.6.2.1 ผลิตภัณฑ์อาหาร

ผลิตอาหารสำหรับนักบินอวกาศ เป็นจุดเริ่มต้นของการทำแห้งอาหารแห้งแบบเยือกแข็งด้วยคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักเบา มีการคืนตัว (Rehydration) ที่รวดเร็ว สามารถรักษารูปร่าง กลิ่น รส และสารอาหารได้ ใกล้เคียงกับของสด ปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารแทบทุกชนิด ผัก ผลไม้ สมุนไพร เมล็ดพืช เนื้อสัตว์ อาหารทะเล ฯลฯ ถูกนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็งในหลากหลายรูปแบบ ทั้งอาหารสด (Fresh Food) อาหารปรุงสำเร็จพร้อมบริโภค (Cooked Food) และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ (Health Product)

2.6.2.2 ผลิตภัณฑ์ด้านเภสัชกรรม

ผลิตภัณฑ์ด้านเภสัชกรรม (Pharmaceutical) และผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ (Medical Products) ส่วนมากเกี่ยวข้องกับโครงสร้างระดับโมเลกุล ซึ่งจำเป็นต้องรักษาองค์ประกอบและการเกิดปฏิกิริยาของสาร ซึ่งค่อนข้างไวต่อการเสื่อมสลาย เนื่องจากความร้อนดังนั้นการทำแห้งแบบเยือกแข็ง จึงถูกนำมาใช้กับการเตรียมตัวอย่าง ผลิตตัวยาทางเภสัชกรรม และการแพทย์จำพวกโปรตีน ฮอร์โมน เอมไซม์ วัคซีน แบคทีเรีย ยีสต์ สารปฏิชีวนะ รวมไปถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น

2.6.2.3 ผลิตภัณฑ์ด้านทางชีวภาพ

ผลิตภัณฑ์ที่ใช้เพื่อการศึกษาทางชีวภาพ (Biological Specimen) มีอยู่หลายประเภทด้วยกันทั้งขนาดใหญ่ เช่น ร่างกาย อวัยวะ ทางกายวิภาคหรือขนาดเล็กระดับเซลล์ โมเลกุล เป็นต้น

2.6.2.4 ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ (Cosmetic) นิยมใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติ ดังนั้นการทำแห้งแบบเยือกแข็งจึงถูกนำมาใช้เพื่อช่วยรักษาคุณค่าของสารชีวภาพจากธรรมชาติซึ่งนอกจากการระเหิดน้ำแล้ว ยังสามารถระเหิดสารทำละลายอินทรีย์ (Solvent) ในกรณีของการสกัดสารได้เช่นกัน

2.6.3 ข้อดีการการทำแห้งเยือกแข็ง

การทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นการทำแห้งขณะที่มีอุณหภูมิต่ำจึงลดการสูญเสียเนื่องจากความร้อนลดการทำลายเนื้อเยื่อและโครงสร้าง จึงทำให้แห้งและมีการคืนตัว (Rehydration) ที่ดี ทำให้สามารถเก็บผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้นและยังคงรักษาคุณสมบัติตามธรรมชาติได้ดี

2.7 การประยุกต์ใช้คอลลาเจน

การนำคอลลาเจนมาใช้ประโยชน์สามารถใช้ได้ทั้งแบบไม่เสื่อมสภาพ (Non-Denatured Collagens) และแบบเสื่อมสภาพ (Denatured Collagens) เช่น คอลลาเจนแบบไม่เสื่อมสภาพจะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม ด้านเครื่องสำอางค์ และการนำคอลลาเจนมาใช้งานทางด้านการแพทย์ จะอยู่ในรูปแบบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering Technology) อาทิ เช่น ผิวหนังสังเคราะห์ (Artificial Skin)

2.7.1 ระบบขนส่งตัวยา (Drug Delivery System)

ฟิล์มคอลลาเจน (Collagen Film/Sheet/Disc) มีความหนาประมาณ 0.01–0.5 มิลลิเมตร ผลิตจากคอลลาเจนที่ไม่มีส่วนของทีโลเปปไทด์และมีรูปแบบการปลดปล่อยตัวยาอย่างช้าๆ ซึ่งตัวยาเหล่านี้สามารถใส่เข้าไปในฟิลม์คอลลาเจน โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจน พันธะโควาเลนต์หรือการดักจับในโครงสร้าง (Entrapment) ซึ่งสามารถผ่านการฆ่าเชื้อแบบสเตอร์ริไลซ์ได้ เมื่อเกิดการย่อยสลาย (Hydrolyzation) จะยังคงรักษาความแข็งแรงพอที่จะทนต่อการใช้งาน เมื่อนำฟิล์ม-คอลลาเจนมาใช้กับดวงตา ฟิล์มนี้จะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ภายหลังการใช้งาน 5-6 ชั่วโมง ฟิล์ม-คอลลา-เจนยังใช้ในการรักษาเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อได้ เช่น เนื้อเยื่อกระจกตาติดเชื้อหรือมะเร็งตับ โดยการรักษาเนื้อเยื่อกระจกตาติดเชื้อจะใช้สารปฏิชีวนะ เช่น Gentamicin และ Tetracycline ใส่ไปในฟิล์ม-คอลลาเจน ผลของการใช้ฟิล์มคอลลาเจนที่มีสาร Tetracycline พบว่า สามารถทำการตรวจพบ Tetracycline ในพลาสมาเป็นเวลามากกว่า 7 วัน ภายหลังการทดลองใช้ในกระต่าย [11] สำหรับการรักษามะเร็ง ฟิล์มคอลลาเจนจะใส่สารยับยั้งมะเร็ง (Ectopocide (VP-16)) พบว่า สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของตัวยาที่บริเวณเป้าหมาย (ตับ) ไว้ได้นานขึ้น นอกจากนี้ฟิล์มคอลลาเจนยังสามารถใช้เป็นตัวขนส่งยีน (Gene Delivery) ได้อีกด้วย เช่น การกระตุ้นการสร้างกระดูก โดยใช้ Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2) และคอลลาเจน พบว่าการใช้ rhBMP-2 ร่วมกับคอลลาเจนจะมีผลในการกระตุ้นการสร้างกระดูก โดยคอลลาเจนมีส่วนช่วยในการยึดเหนี่ยวเซลล์ต่างๆ และยังมีส่วนช่วยในการเชื่อมกระดูกแต่หากใช้เพียงคอลลาเจนอย่างเดียวจะไม่มีผลในการสร้างกระดูก

คอลลาเจนชิลด์ (Collagen Shields) ถูกออกแบบเพื่อเป็นสิ่งปิดกระจกตา (Corneal Bandages) ซึ่งสามารถละลายได้ในกระจกตา เพื่อกระตุ้นการรักษาบาดแผลภายหลังการปลูกถ่ายกระจกตา (Corneal Transplantation) หรือการผ่าตัดกระจกตา (Radial Keratomy) คอลลาเจนชิลด์สำหรับดวงตาผลิตจากเนื้อเยื่อเปลือกลูกตาหมู เนื่องจากมีโมเลกุลคอลลาเจนคล้ายกับคอลลา-เจนของตาคนมาก คุณสมบัติทางกายภาพของคอลลาเจนชิลด์ คือ ป้องกันส่วนหน้าของกระจกตา (Corneal Epithelium) ที่กำลังรักษาจากการกระทบของหนังตา อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นการรักษาส่วนหน้าของกระจกตาจากการปลูกถ่ายกระจกตาและการผ่าตัดกระจกตา การขนส่งตัวยาของคอลลาเจนชิลด์จะขึ้นกับปริมาณของยาและการปลดปล่อยยาของชิลด์ สำหรับตัวยาที่ละลายน้ำได้โครงสร้าง

คอลลาเจนจะทำหน้าที่เสมือนที่กักเก็บและตัวยาจะถูกดักจับไว้ในช่องว่างของโครงสร้างคอลลาเจน แต่สำหรับตัวยาที่ไม่ละลายน้ำ ตัวยาจะเข้าไปรวมกับตัวซิลด์ ขณะที่ตัวยาไหลออกมาจากซิลด์และซิลด์ละลายจะทำให้มีชั้นของของเหลวซึ่งทำหน้าที่หล่อลื่นผิวหน้าของตาลดการเสียดสีของหนังตากับกระจกตา เพิ่มเวลาการสัมผัสระหว่างตัวยากับกระจกตาและช่วยรักษาส่วนหน้าของกระจกตา อย่างไรก็ตาม การใช้คอลลาเจนซิลด์เป็นตัวขนส่งตัวยายังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ลดความสามารถในการมองเห็น เนื่องจากการบดบังและระยะเวลาที่อยู่ในบริเวณกำหนดสั้น อีกทั้งผลข้างเคียงของคอลลาเจนซิลด์ [1] ซึ่งได้รายงานการใช้คอลลาเจนซิลด์กับตาของกระต่ายและหนูตะเภา ผลที่ได้พบว่าอาจแสดงความเป็นพิษหรืออาจเกิดจากการอักเสบขณะสอดใส่คอลลาเจนซิลด์

คอลลาเจนสปอนจ์ (Collagen Sponges) นิยมใช้ในการรักษาบาดแผลไฟไหม้และตกแต่งบาดแผล ซึ่งเมื่อทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (In Vitro) พบว่า ได้ผลดี คอลลาเจนสปอนจ์มีความสามารถในการดูดซับของเหลวจากเนื้อเยื่อได้ปริมาณมาก ทำให้แผลแห้ง อีกทั้งยังป้องกันการกระแทกและการติดเชื้อ คอลลาเจนสปอนจ์ยังใช้เป็นตัวขนส่งตัวยาจำพวกยาคุมกำเนิด โดยมีข้อดีในเรื่องการควบคุมการปลดปล่อยสารฆ่าเชื้ออสุจิและช่วยลดการระคายเคืองของเนื้อเยื่อคอลลาเจนสปอนจ์สามารถเตรียมได้โดยการทำแห้งแบบเยือกแข็งของสารละลายกรดหรือด่างที่มีคอลลาเจนพองตัวอยู่ประมาณร้อยละ 0.1-5 โดยสามารถกำหนดความพรุนของคอลลาเจนสปอนจ์ได้ โดยกำหนดความเข้มข้นของคอลลาเจนในสารละลายและอัตราการทำแห้งแบบเยือกแข็ง [8]

2.7.2 รักษาบาดแผล (Dermal Wound Healing)

กระบวนการรักษาบาดแผลเป็นกลไกเชิงซ้อนที่เกี่ยวข้องกับระบบของร่างกายหลายอย่างซึ่งรวมทั้งระบบภูมิคุ้มกัน กระบวนการรักษาบาดแผลนี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ Haemostasis Process และ Inflammation Process Proliferation และ Maturation สุดท้าย คือ Remodeling Process เมื่อเกิดบาดแผลขึ้น เกล็ดเลือดจะออกมาจากชั้น Subendothelial Collagen เป็นผลให้เกิดการรวมตัวกันของเกล็ดเลือดและกระตุ้นให้เกล็ดเลือดนี้เปลี่ยนเป็นก้อนหนาหนืด (Coagulation) ต่อมา Fibrin Clots จะถูกสร้างขึ้น ซึ่ง Fibrin Clots นี้มีความจำเป็นต่อการปิดบาดแผลชั่วคราว เพื่อจะทำการเตรียมสร้างโครงสร้างของเซลล์ต่างๆ เช่น Neutrophil Monocyte Fibroblast และ Endothelial Cell นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของหลอดเลือด การปลดปล่อยสาร Prostaglandin Chemotactic Substances Complement Factor Interleukin-1 Tumor Necrotic factor-α (TNF-α) และ Transforming Growth Factor-β (TGF-β) ซึ่งเป็น Bacterial Product โดยมีผลไปกระตุ้นการเคลื่อนย้าย Neutrophil ไปยังบาดแผล ตามด้วยการเคลื่อนย้าย Macrophage Lymphocyte และ Fibroblast ตามลำดับ Wound Macrophage ได้มาจาก Blood Macrophage ที่เคลื่อนมายังบริเวณบาดแผล macrophage มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการอักเสบ (Inflammatory Process) เซลล์ผิวหนัง (Fibroblast) จะเคลื่อนที่ไปยังช่องว่างบาดแผลเพื่อสร้างและสะสมไกลโคโปรตีนและคอลลาเจน การเคลื่อนที่เหล่านี้

ส่วนใหญ่เป็นผลจาก Macrophage Derived Cytokines เช่น TGF-β, Epidermal Growth Factor (EGF) และ Platelet Derived Growth Factor (PDGF) หลังจากเกิดบาดแผล 2-3 วัน เนื้อเยื่อที่บาดเจ็บจะเข้าสู่กระบวนการ Proliferation โดย Fibroblast และ Endothelial Cell ที่อยู่ใกล้ๆ บาดแผลจะเริ่มแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน ซึ่งเป็นผลจาก Growth Factors Cytokines Derived Platelet และ Activated Macrophage ต่อมา Endothelial Cell จะเริ่มสร้างเส้นเลือดฝอยและหลอมรวมกับท่อต่างๆ หรือ Endothelial Bud ซึ่งทำให้เลือดไหลเวียนได้อีกครั้งขณะเดียวกัน White Blood Cell จะเข้าสู่ Apoptosis และถูก Macrophage ย่อยช่องว่างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเริ่มถูกเติมเต็มด้วยโปรตีโอไกลแคน (Proteoglycan) โปรโทคอลลาเจน (Protocollagen) และโทรโปคอลลาเจน (Tropocollagen) ซึ่งเป็นบทบาทของกระบวนการ Differentiation โดยส่วนประกอบที่ปรากฏในช่องว่างบาดแผลจะเรียกว่า Granulation Tissue จากนั้น Tensile Strength ของบาดแผลจะดีขึ้นเรื่อยๆ ในระหว่างช่วงของ Maturation และช่วงของ Remodeling บาดแผลจำเป็นต้องมี Barrier Protection เพื่อป้องกันการติดเชื้อ ช่วยให้แผลแห้ง และเป็นโครงสร้างให้เซลล์มาเชื่อมติดกัน ดังนั้นเพื่อการรักษาบาดแผลที่สมบูรณ์จึงควรปิดบาดแผลด้วยวัสดุที่มี Epidermal Analogues และ Dermal Analogues ที่ผสมตัวยาเอาไว้ วัตถุดิบเริ่มต้นของ Dermal Layer ส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์จากคอลลาเจนหรือคอลลาเจนที่จะทำให้สามารถเชื่อมกับ Extracellular Matrices อื่นๆ เช่น Glycosaminoglycan Hyaluronic Acid หรือ Fibroblast Cell นอกจากนี้ทำให้คอลลาเจนจะมีความสำคัญในการเชื่อมติดเซลล์ การเติบโตและการ Differentiation ของเซลล์แล้ว Extracellular Matrix ยังมีคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น สามารปลดปล่อยสารที่ช่วยการเชื่อมติดกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Fibroblast และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงชนิดเซลล์ของ Fibroblast อีกด้วย [6]

บทที่ 3
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2003 J. Muyonga และคณะ [12] ได้ทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากะพงรุ่นเยาว์และรุ่นโตเต็มวัย โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พบว่า ปริมาณคอลลาเจนที่ได้จากปลากะพงรุ่นเยาว์ต่อน้ำหนักแห้งได้ปริมาณคอลลาเจนมากกว่าปลากะพงรุ่นโตเต็มวัย และเมื่อได้นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า คอลลาเจนที่สกัดได้ประกอบไปด้วย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนมากกว่าปลาชนิดอื่นๆ ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสสูงกว่าปลาชนิดอื่นด้วย จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี FT-IR พบว่า ในคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลากะพงรุ่นเยาว์มีระดับโมเลกุลสูงกว่าปลากพงรุ่นโตเต็มวัย จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าอายุของหนังปลาที่ใช้มีผลต่อความสัมพันธ์ของปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

ในปี ค.ศ. 2004 Lin และ Liu [13] ได้ทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังเท้าไก่ โดยตัวแปรที่ทำการศึกษา คือ สัดส่วนหนังต่อกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวล อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 4, 12, 18 และ 24 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการสกัด 24, 36, 48 และ72 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากหนังเท้าไก่ คือ อุณหภูมิในการสกัด 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนมากที่สุด เมื่อศึกษาคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 18 และ 24 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณของสาย α ลดลง มีสายเปปไทด์สายสั้นๆ เกิดขึ้น ซึ่งไม่สามารถตกตะกอนด้วยโซเดียมคอลไรด์ที่ความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ ได้เป็นผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ลดลง นอกจากนั้นยังพบว่า การย่อยของเอนไซม์เปปซินและกรดเกิดขึ้นได้รวดเร็ว จึงทำให้โครงสร้างสามมิติของคอลลาเจนที่สกัดที่อุณหภูมินี้ถูกทำลาย จึงทำให้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในทางการแพทย์

ในปี ค.ศ. 2006 C.Pipatcharoenwong [14] ได้ทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงแดงซึ่งเกล็ดปลากะพงแดงมีองค์ประกอบหลัก คือ โปรตีนและเถ้าเพื่อให้ได้เกล็ดปลาที่มีปริมาณโปรตีนสูงจึงทำการศึกษาหาวิธีการกำจัดแคลเซียมพบว่า การแช่เกล็ดปลาในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะทำให้มีปริมาณเถ้าที่เหลืออยู่ในเกล็ดปลาน้อยกว่าร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำเกล็ดปลาที่กำจัดเถ้าแล้วมาศึกษาขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนซึ่งประกอบด้วยการสกัด 2 ขั้นตอน คือ การสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน โดยศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดทั้ง 2 ขั้นตอน พบว่าอุณหภูมิและเวลาในการสกัดทั้ง 2 ขั้นตอนมีผลต่อขนาดโมเลกุลของเปปไทด์และปริมาณโปรตีนในคอลลาเจนที่สกัดได้ โดยวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ การสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ตามด้วยการสกัดด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงให้

เห็นว่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลาที่สกัดได้เป็นคอลลาเจน type I ซึ่งมีองค์ประกอบของหน่วยย่อย β $\alpha 1$ และ $\alpha 2$

ในปี ค.ศ. 2007 I. Prasertsung และคณะ [5] ได้ทำการศึกษาการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมูด้วยกระบวนการการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับเอนไซม์ โดยศึกษาถึงผลกระทบของชนิดเอนไซม์ ทริปซิน (Trypsin) และดิสเปส II (Dispase II) และสภาวะการเพิ่มความดันแบบช่วง ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการขจัดเซลล์ในผิวหนังหมู จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความดันแบบช่วงทำให้เวลาที่ใช้ในการแช่ในเอนไซม์สั้นลง เพราะสารละลายเอนไซม์สามารถแทรกซึมเข้าไปในหนังหมูที่อัดแน่นได้ เป็นผลให้ขจัดเซลล์ออกจากหนังหมูได้ง่ายขึ้นเมื่อใส่เอนไซม์ที่เตรียมใหม่ลงไปในกระบวนการขจัดเซลล์ทำให้ร้อยละของการขจัดเซลล์สูงขึ้น เนื่องจากไม่มีการยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้นจากเซลล์ที่ถูกขจัดออกมา จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า การประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ในโครงสร้างที่ซับซ้อนของหนังหมูได้ดีขึ้น

ในปี ค.ศ. 2009 M. Ahmad [15] ได้ทำศึกษาการสกัดและลักษณะของคอลลาเจนจากหนังปลาวัว (monocerous Aluterus) ด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และเปปซินจากปลาทูน่าครีบยาว ปลาทูน่าเหลืองหรือเปปซินจากสุกรที่ระดับ 20 ยูนิต/กรัมของผิวไขมันต่ำ พบว่า ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลาจากปลาทูน่าครีบเหลือง (APSC) มีปริมาณคอลลาเจนมากที่สุด ซึ่งคอลลาเจนที่สกัดได้พบว่า เป็นคอลลาเจนประเภทที่ 1 ซึ่งมีสายโซ่ $\alpha 1$ สองสายและสายโซ่ $\alpha 2$ หนึ่งสายโดยไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี ATR-FTIR พบว่าโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้มีโครงสร้างเกลียวสามที่เสถียรพบว่า คอลลาเจนที่สกัดได้จากกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ จะมีการสูญเสียเสถียรภาพจากความร้อนเร็วกว่าที่สกัดจากเอนไซม์ ดังนั้นจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารละลายที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของคอลลาเจนและปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

ในปี ค.ศ. 2009 Defu Li และคณะ [16] นำเสนอการศึกษาจากงานวิจัยที่เป็นการศึกษาการสกัดคอลลาเจนโดยใช้อัลตราโซนิคร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ซึ่งทำการสกัดเปรียบเทียบผลการสกัด (Yield) กับการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์เปปซินเพียงอย่างเดียว เพื่อเปรียบเทียบผลการสกัด (Yield) พบว่า การใช้อัลตราโซนิคร่วมกับเอนไซม์เปปซินทำให้ผลการสกัดเพิ่มขึ้น จากการวิเคราะห์โครงสร้างคอลลาเจนที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธี โดยใช้เครื่อง FT-IR พบว่า การสกัดด้วยอัลตราโซนิคร่วมกับเอนไซม์เปปซินไม่ส่งผลให้โครงสร้างของคอลลาเจนเสียสภาพ จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscopy) และวิธี Circular Dichroism พบว่า การสกัดคอลลาเจนโดนใช้อัลตราโซนิคร่วมกับเอนไซม์เปปซินส่งผลทำให้เกิดการเสียภาพของคอลลาเจน จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า การประยุกต์ใช้แรงกลร่วมกับการสกัดคอลลาเจนด้วยเอมไซม์สามารถเพิ่มปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

ในปี ค.ศ. 2011 P.Singh และคณะ [17] นำเสนอคุณลักษณะการสกัดคอลลาจนจากหนังของปลาดุกทะเล ซึ่งมีวิธีในการสกัด 2 วิธี คือ โดยใช้กรดในการสกัดและใช้เอนไซม์เปปซินในการสกัด

ซึ่งจากผลการสกัดคอลลาเจนจากทั้ง 2 วิธี พบว่า การใช้กรดในการสกัดมีปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 5.1 และการใช้เปปซินในการสกัดมีปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 7.7 และมีการตรวจสอบโครงสร้างคอลลาเจนจากการสกัด โดยใช้เครื่อง FT-IR พบว่า ไม่ไม่มีการเสียสภาพแม้ว่าจะใช้กรดในการสกัดหรือใช้เอนไซม์เปปซินในการสกัดโครงสร้างเกลียวสามทั้ง 3 สายของคอลลาเจนและจากการวิเคราะห์ในทุกขั้นตอนของการทดลองพบว่า การใช้กรดในการสกัดและใช้เอนไซม์เปปซินในการสกัดจะทำงานได้ดีที่ pH มากกว่า 4 และความเข้มข้นของ NaCl สูงกว่าร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร อุณหภูมิสูงสุดที่ทำให้การสกัดโดยใช้กรดและการสกัดโดยใช้เอนไซม์เสียสภาพคือที่ 39.3 และ 39.6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ในปี ค.ศ.2012 S. Zung และคณะ [18] ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและลักษณะของคอลลาเจนจากหนังของปลาช่อนทะเลโดยใช้กรดอะซิตริกและเอนไซม์เปปซินในการสกัดคอลลาเจน พบว่า การสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละสายกรดอะซิติกมีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 35.5 และการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์มีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 12.3 คอลลาเจนที่พบเป็นคอลลาเจนประเภท type I ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างโมเลกุลครบ 3 สาย คือ $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ จากการวิเคราะห์ทางความร้อนพบว่า คอลลาเจนเสียสภาพในกรดอะซิตริกและเอนไซม์เปปซินที่อุณหภูมิ 34.62 และ 33.97 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อุณหภูมิสูงสุดที่ทำให้เสียสภาพ คือ ที่การสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละสายกรดอะซิติก 38.17 และที่การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์ 36.03 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยกรดอะซิตริกมีปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มากกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์เปปซิน

จากงานวิจัยของ Defu Li และคณะ [16] ได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิคแรงกลร่วมกับการสกัดคอลลาเจน ซึ่งได้นำเสนอการศึกษาการสกัดคอลลาเจนโดยใช้อัลตราโซนิคร่วมกับเอนไซม์เปปซินในการสกัดคอลลาเจน จากการศึกษาพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบปั่นกวนและจากรายงานงานวิจัยของ I. Prasertsung และคณะ [5] ทำการประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง ซึ่งเป็นเทคนิคทางกลเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้งานร่วมกับเอนไซม์ได้ จากรายงานได้ศึกษาการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมู ในกระบวนการเตรียมดังกล่าวได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับเอนไซม์ในการกำจัดเซลล์ออกจากผิวหนังของหมูที่มีความซับซ้อน จากการศึกษาพบว่า การประยุกต์ใช้เทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์ออกจากโครงสร้างของหนังหมูได้สูงขึ้นเนื่องจากการเพิ่มแรงดันสามารถช่วยทำให้เอนไซม์สามารถแทรกซึมเข้าไปในหนังหมูได้ดีขึ้นส่งผลให้เซลล์ถูกกำจัดได้มากขึ้น

ดังนั้นจากรางงานวิจัยที่กล่าวมานี้จึงจะทำการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยใช้กระบวนการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกและเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง

บทที่ 4
วิธีการทดลอง

4.1 สารเคมีและอุปกรณ์

4.1.1 หนังหมูสดจากหมูช่วงอายุ 3-6 เดือน

4.1.2 เอนไซม์เปปซิน (จากกระเพาะของสุกร) ยี่ห้อ Fluka Biochemika

4.1.3 อะซิโตน ยี่ห้อ RCI Labscan Limited Grade AR

4.1.4 กรดอะซิติก ยี่ห้อ QRëC Grade AR

4.1.5 น้ำกลั่น

4.1.6 ผ้าขาวบาง

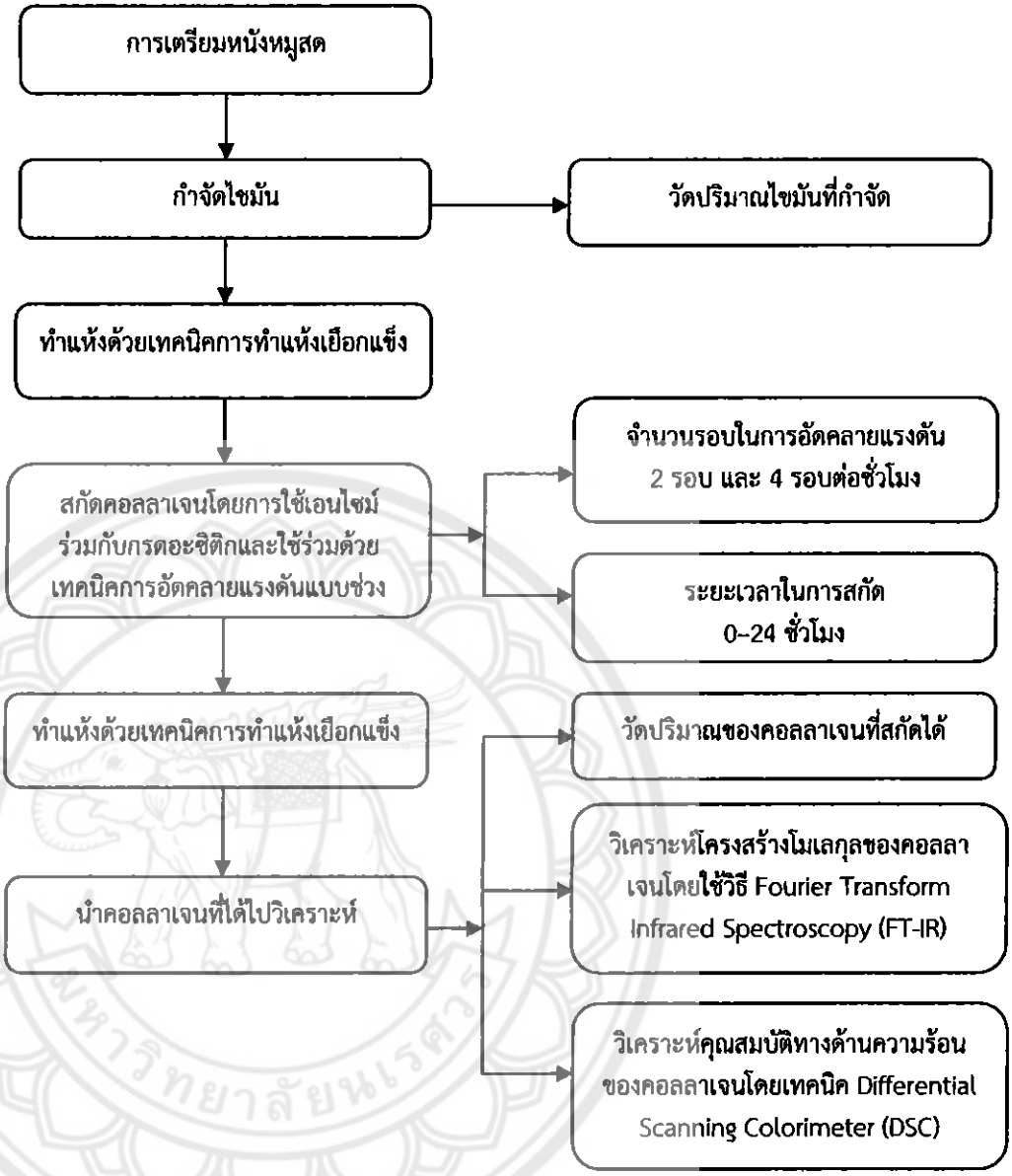
4.1.7 เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized)

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

4.1.9 เครื่องปั่นกวนสาร รุ่น RW 20 Digital ยี่ห้อ IKA

4.1.10 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

4.1.11 Differential Scanning Colorimeter (DSC)



รูปที่ 4.1 แผนผังกระบวนการในการสกัด

4.2 วิธีการทดลอง

ในการศึกษาการสกัดคอลลาเจนมีขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจนดังแสดงในรูปที่ 3 โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการสกัดดังนี้

4.2.1 การเตรียมหนังหมู

นำหนังหมูมาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำไปกำจัดไขมันที่ติดอยู่ใต้หนังออกโดยการเฉือนด้วยมีดสะอาด หลังจากนั้นนำหนังหมูไปบดให้ได้ขนาดเล็กที่สุด แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -15 องศาเซลเซียส

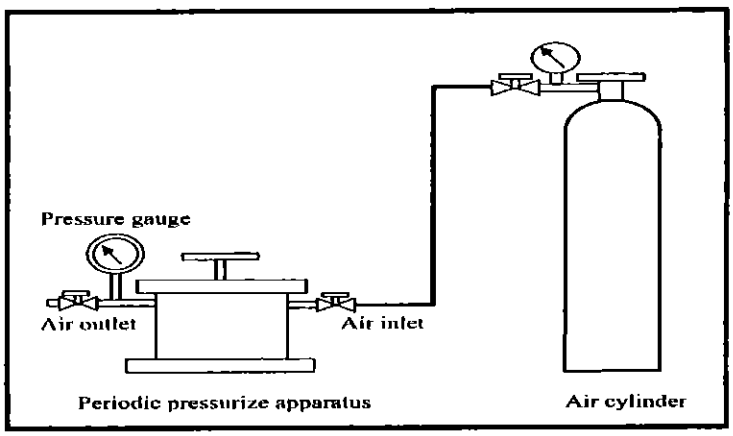
4.2.2 การกำจัดไขมัน

นำหนังหมูที่บดละเอียดแล้วมากำจัดไขมันโดยการใช้อะซิโตนโดยอัตราส่วนระหว่างหนัง-หมูต่อสารละลายอะซิโตนที่ใช้ คือ 1:10 (w/v) แล้วนำไปปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 รอบ แล้วนำหนังหมูที่ผ่านการกำจัดไขมันไปแช่แข็ง (Freeze) เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง โดยวัดปริมาณน้ำหนักไขมันที่ถูกกำจัดได้จากสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำหนักไขมันที่ถูกกำจัด} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100 \qquad (4.1)$$

4.2.3 การสกัดคอลลาเจนจากหนังหมูโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับกรดอะซิติกและเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique)

นำหนังหมูสดที่ผ่านการกำจัดไขมันและทำแห้งแล้วนำมาสกัดคอลลาเจนโดยผสมเข้ากับเอนไซม์เปปซิน 0.1% (w/v) ร่วมกับสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยกลุ่มตัวอย่างแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยที่กลุ่มที่ 1 เป็นการสกัดคอลลาเจนที่ไม่ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique) ซึ่งทำการสกัดโดยการปั่นกวนใช้เวลาในการสกัดในช่วง 0-24 ชั่วโมง กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique) ร่วมด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับกรดอะซิติกดังแสดงในรูปที่ 4 โดยใช้จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันทุกๆ 30 นาที (2 รอบต่อชั่วโมง) ที่ความดัน 4 บาร์ ซึ่งใช้เวลาในการสกัดในช่วง 0-24 ชั่วโมง กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique) ร่วมด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับกรดอะซิติก โดยใช้จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันทุกๆ 15 นาที (4 รอบต่อชั่วโมง) ที่ความดัน 4 บาร์ ซึ่งใช้เวลาในการสกัดในช่วง 0-24 ชั่วโมง โดยขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจนจะควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดในช่วงอุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส



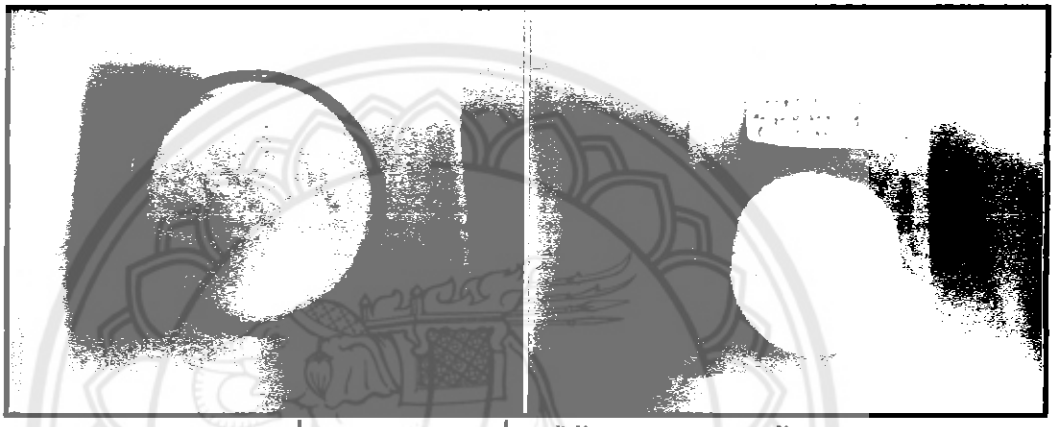
รูปที่ 4.2 กระบวนการอัดคลายแรงดันแบบช่วง [5]

4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติ

4.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ (% Yield)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้โดยจะใช้สัดส่วนของน้ำหนักของหนังหมูหลังจากผ่านการทำแห้งต่อน้ำหนักคอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากผ่านการทำแห้ง สามารถคำนวณหาปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากสมการ [8]

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากการทำแห้ง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักหนังหมูหลังจากการทำแห้ง (กรัม)}} \times 100 \qquad (4.2)$$



รูปที่ 4.3 คอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากการทำแห้ง

4.3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของคอลลาเจน

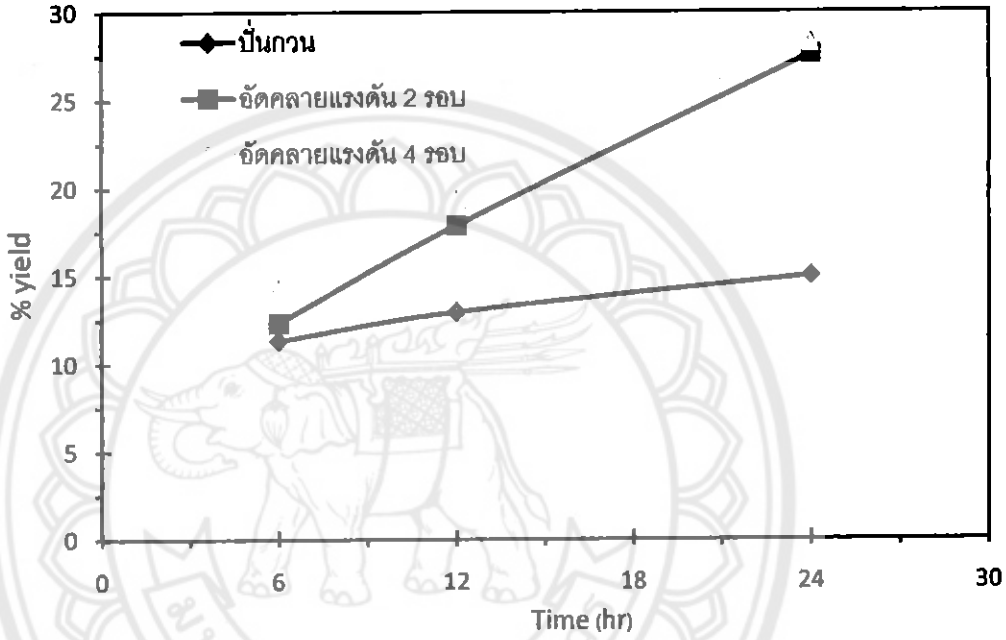
การวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อนของคอลลาเจนสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Colorimeter (DSC) นำคอลลาเจนที่ผ่านการทำแห้ง โดยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) น้ำหนัก 15 มิลลิกรัม ใส่ใน Aluminum Pan และนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อน โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) โดยใช้อัตราในการให้ความร้อน (Heating Rate) เท่ากับ 1 องศาเซลเซียสต่อนาที ในช่วงอุณหภูมิ 25-350 องศาเซลเซียส

4.3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน

การศึกษาสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนโดยการใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) เพื่อใช้ในการตรวจสอบโครงสร้างของคอลลาเจนที่สกัดได้ โดยนำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปทำแห้ง ด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry) แล้วนำมาบดผสมเข้ากับ KBr โดยให้มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.01 อัดขึ้นรูปให้ได้แผ่นบางประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วนำตัวอย่างที่ขึ้นรูปได้ไปวัดด้วยเครื่อง FT-IR ที่ Resolution 4 ซม$^{-1}$ และจำนวนสแกน 128 ครั้ง [16]

บทที่ 5
ผลการทดลองและการวิเคราะห์

5.1 ผลของสภาวะการสกัดคอลลาเจนที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ (%Yield)



รูปที่ 5.1 ปริมาณของคอลลาเจนที่สกัดได้

5.1.1 ผลของการประยุกต์ใช้การอัดแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ (% Yield)

จากการศึกษาปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่า การสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีการปั่นกวนที่เวลา 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 11.31 หลังจากนั้นเพิ่มเวลาในการสกัดคอลลาเจนเป็น 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 12.94 เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดคอลลาเจนเป็น 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 14.99

การสกัดคอลลาเจนด้วยการประยุกต์ใช้การอักคลายแรงดันพบว่า การสกัดคอลลาเจนโดยการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดัน 2 รอบต่อชั่วโมง ที่เวลา 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 12.32 เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดคอลลเจนเป็น 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 17.88 และเวลาในการสกัดคอลลาเจน 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 27.59

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันส่งผลทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นทุกๆ ช่วงเวลาของการสกัดคอลลาเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดคอลลาเจนแบบการปั่นกวน เนื่องจากการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันสามารถช่วยทำให้การแทรกซึมของเอนไซม์เข้าไปในผิวหนังหมูที่มีความซับซ้อนได้มากขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ I.Prasertsung และคณะ [5] ซึ่งทำการศึกษาการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังหมูด้วยกระบวนการการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับเอนไซม์พบว่า การประยุกต์ใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์ออกจากโครงสร้างของหนังหมูได้สูงขึ้นเนื่องจากการเพิ่มแรงดันสามารถช่วยทำให้เอนไซม์สามารถแทรกซึมเข้าไปในหนังหมูได้ดีขึ้นส่งผลให้เซลล์ถูกกำจัดได้มากขึ้น

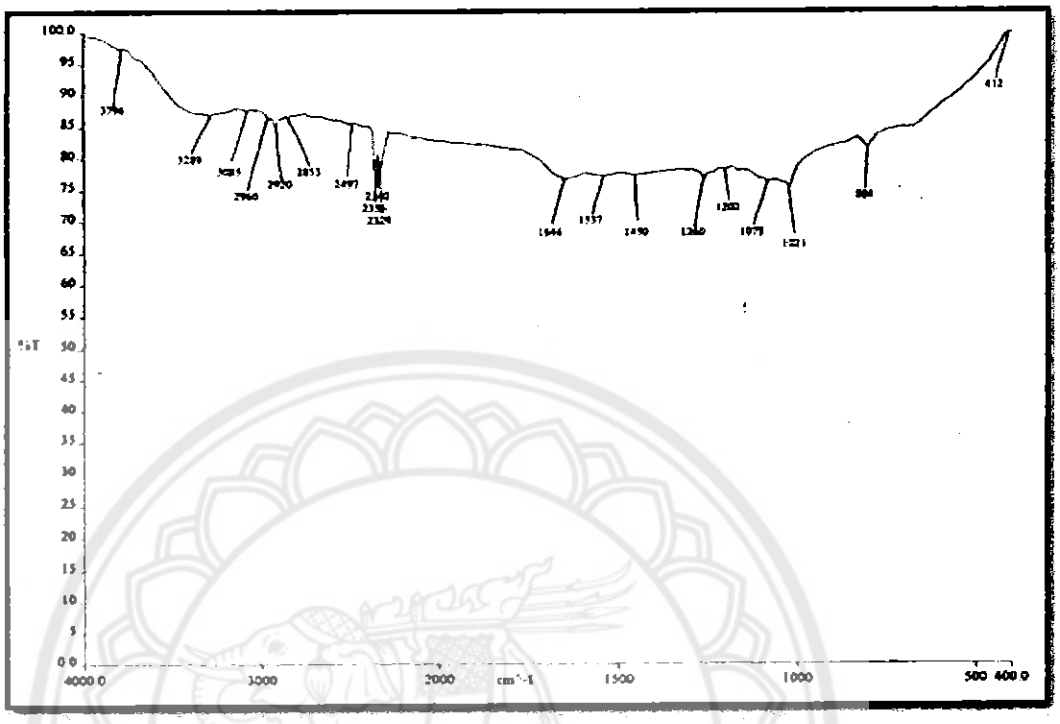
5.1.2 ผลของจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ (% Yield)

จากการศึกษาผลของจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันที่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่า การสกัดคอลลาเจนด้วยการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันที่ 2 รอบต่อชั่วโมง เมื่อผ่านการสกัดคอลลาเจนเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 12.32, 17.88 และ 27.59 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มจำนวนรอบการอัดคลายแรงดันเป็น 4 รอบต่อชั่วโมง พบว่า เมื่อผ่านการสกัดคอลลาเจนเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณคอลลา-เจนที่สกัดได้เป็นร้อยละ 14.30, 19.33 และ 28.26 ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันจาก 2 รอบต่อชั่วโมง เป็นอัดคลายแรงดัน 4 รอบต่อชั่วโมง ในการอัดคลายแรงดันไม่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ไม่มีความแตกต่างกันมาก เนื่องจากจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันได้ศึกษาที่ 2 รอบต่อชั่วโมง และ 4 รอบต่อชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันมากจึงทำให้ไม่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ หากทำการศึกษาเพิ่มจำนวนรอบการอัดคลายแรงดันเป็น 6 รอบต่อชั่วโมง อาจส่งผลให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ในช่วงเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเข้าช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ไม่เพิ่มขึ้นเนื่องจากเริ่มเข้าสู่สมดุล ชี้ให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มจำนวนอบมากขึ้นไม่ส่งผลให้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้น

5.2 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน

5.2.1 ลักษณะของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน



รูปที่ 5.2 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน [19]

จากรูปที่ 8 แสดงถึง FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน โดยทั่วไปแล้วคอลลาเจน Type I ที่สกัดได้จากหนังหมูจะแสดงลักษณะของการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 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 ดังแสดงในตารางที่ 5

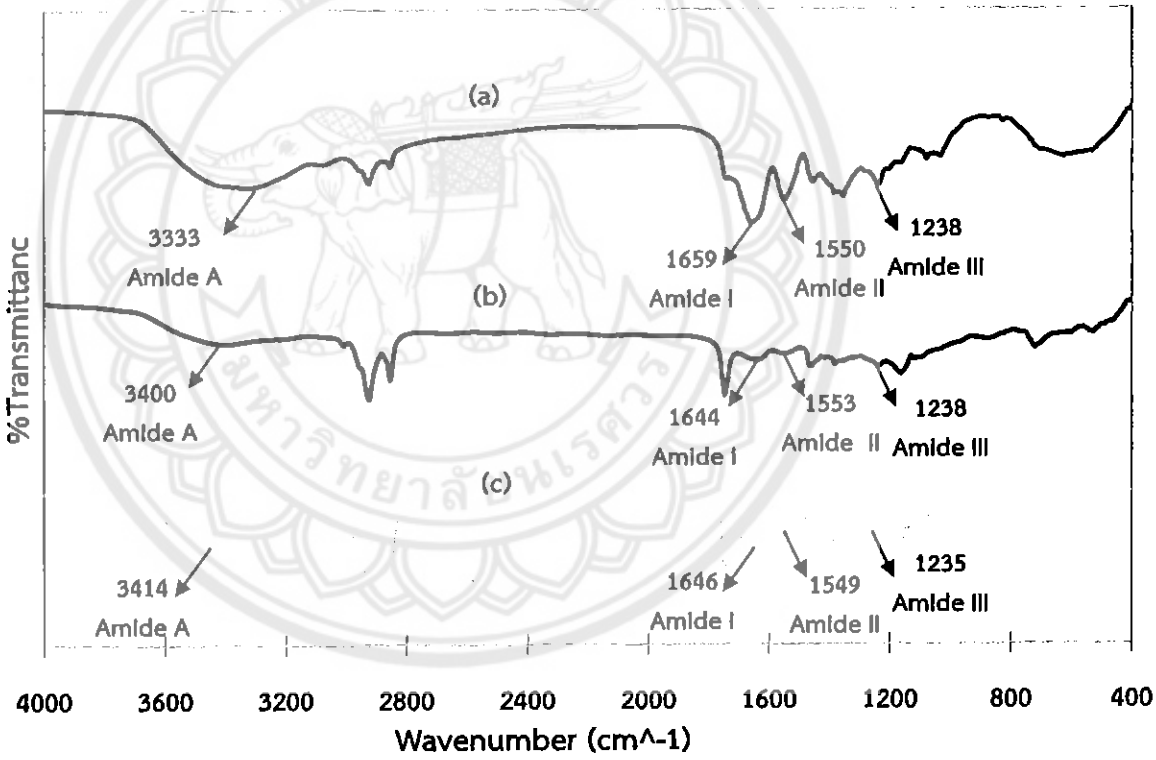
ตารางที่ 5.1 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน [19]

Region	Standard	Assignment
Amide A	3289	NH Stretch Coupled with Hydrogen Bond.
Amide B	2920	CH_2 Asymmetrical Stretch.
	2853	CH_2 Asymmetrical Stretch.
Amide I	1644	C=O Stretch/Hydrogen Bond Coupled with CN Stretch.

ตารางที่ 5.1 (ต่อ) องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน [19]

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

5.2.2 ลักษณะของ FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้



รูปที่ 5.3 FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธี (a) การปั่นกวน (b) การอัดคลายแรงดัน 2 รอบต่อชั่วโมง (c) การอัดคลายแรงดัน 4 รอบต่อชั่วโมง

จากรูปที่ 9 แสดงถึง FT-IR สเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีการปั่นกวนและเทคนิคการอัดคลายแรงดัน จากการวิเคราะห์พบว่า คอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีการปั่นกวนแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3333 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch ที่ตำแหน่ง 1659 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง 1550 ซม$^{-1}$

แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch และที่ตำแหน่ง 1238 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch

คอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดัน 2 รอบต่อชั่วโมง แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3400 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch ที่ตำแหน่ง 1644 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง 1553 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch และที่ตำแหน่ง 1238 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch

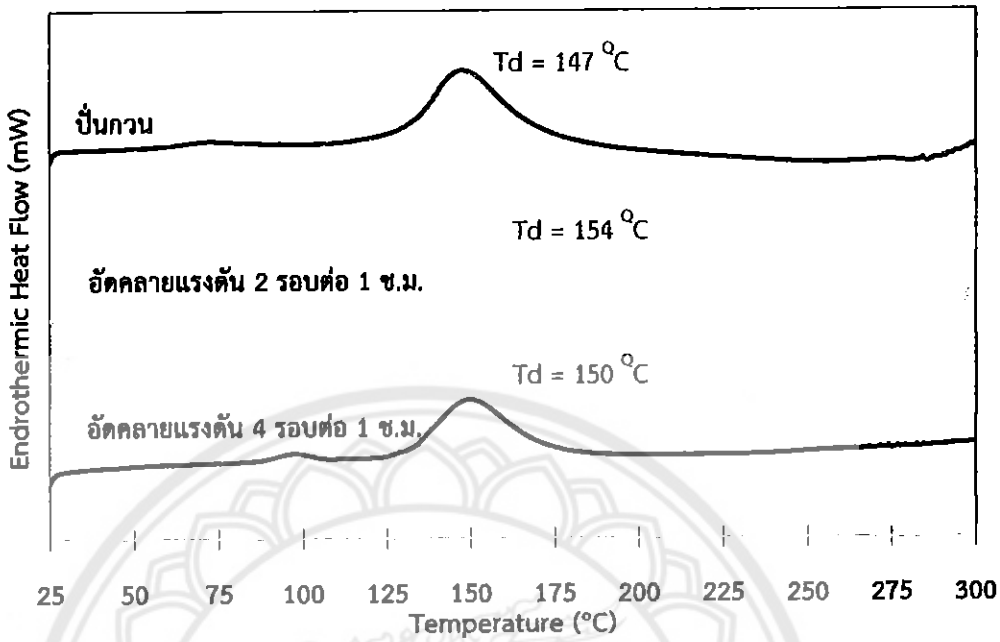
คอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดัน 4 รอบต่อชั่วโมง แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3414 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch ที่ตำแหน่ง 1646 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง 1549 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch และที่ตำแหน่ง 1235 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Bend คู่กับ CN Stretch

จากการทดลองพบว่า ลักษณะการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้ทั้ง 3 วิธี แสดงตำแหน่งที่สอดคล้องกับคอลลาเจนมาตรฐาน ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การประยุกต์การอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้ กล่าวได้ว่าการประยุกต์ใช้แรงกลไม่ทำลายหรือไม่ชักนำให้โครงสร้างทางเคมีของคอลลาเจนเสียสภาพ [5] และจากรูปที่ 9 ยังแสดงฟีคของสารละลายกรดอะซิตริกที่ยังหลงเหลืออยู่เล็กน้อย ซึ่งกรดอะซิตริกมีสูตรโครงสร้าง คือ CH_3COOH และมีหมู่ฟังก์ชันดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5.2 องค์ประกอบของ FT-IR สเปกตรัมของกรดอะซิตริกมาตรฐาน [19]

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

5.3 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของคอลลาเจน



รูปที่ 5.4 แสดงลักษณะ DSC เทอร์โมแกรมของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีการปั่นกวน เทคนิคการอัดคลายแรงดันที่ 2 รอบต่อชั่วโมง และที่ 4 รอบต่อชั่วโมง

จากการศึกษาสมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจน จากรูปที่ 10 แสดงลักษณะ DSC เทอร์โมแกรมของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีการปั่นกวน เทคนิคการอัดคลายแรงดันที่ 2 รอบต่อชั่วโมง และที่ 4 รอบต่อชั่วโมง จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิการเสียสภาพ (Denaturation Temperature, T_d) ของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยทั้ง 3 วิธี เป็น 147, 154 และ 150 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่า คอลลาเจนที่สกัดได้หลังจากเพิ่มเทคนิคการอัดคลายแรงดันมีคุณสมบัติทางด้านความร้อนดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีการปั่นกวน โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิการเสียสภาพของคอลลาเจนขึ้นกับระดับการเชื่อมขวาง (Cross Link) ในระหว่างสายโซ่ [20] ซึ่งเทคนิคการอัดคลายแรงดันหรือการใช้แรงกลสามารถชักนำทำให้คอลลาเจนที่สกัดได้เกิดการเชื่อมขวางระหว่างสายโซ่ซึ่งทำให้โครงสร้างของสายอีลิกซ์สามสายมีความคงตัวและทนความร้อนได้ดี จึงส่งผลทำให้มีค่าอุณหภูมิการเสียสภาพสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีการปั่นกวน ซึ่งกระบวนการนี้มีการดูดพลังงานเข้าไปเพื่อกระตุ้นก่อนทำให้คอลลาเจนเสียสภาพ ซึ่งพีคที่ปรากฏขึ้นชี้ให้เห็นว่าถึงแม้ว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีปั่นกวนและเทคนิคการอัดคลายแรงดัน 2 รอบต่อชั่วโมง จะมีอุณหภูมิในการเสียสภาพที่จุดเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน แต่คอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีปั่นกวนจะใช้พลังงานเข้าไปกระตุ้นมากกว่า ซึ่งเกิดจากโครงสร้างของคอลลาเจนที่มีลักษณะเป็นเส้นใยจับตัวกันหนาแน่นและเกิดการเชื่อมขวาง (Cross Link) ในระหว่างสายโซ่ของคอลลาเจน

บทที่ 6
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 บทสรุป

การสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซิน โดยวิธีการปั่นกวน เทคนิคการอัดคลายแรงดันที่ 2 รอบต่อชั่วโมง และที่ 4 รอบต่อชั่วโมง พบว่า การประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันส่งผลทำให้ปริมาณคอลลา-เจนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นทุกๆ ช่วงเวลาของการสกัดคอลลาเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดคอลลาเจนแบบการปั่นกวน การเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันไม่ส่งผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ทำให้ได้ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ไม่แตกต่างกัน ในการประยุกต์การอัดคลายแรงดันแบบช่วงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติความสามารถทางด้านเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้ กล่าวได้ว่าการประยุกต์ใช้แรงกลไม่ทำลายหรือไม่ชักนำให้โครงสร้างของคอลลาเจนเสียสภาพ สมบัติทางด้านความร้อนของคอลลาเจนที่สกัดทั้ง 3 วิธี มีค่าอุณหภูมิการเสียสภาพ (T_d) เป็น 147, 154 และ 150 องศา-เซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งคอลลาเจนที่สกัดได้จากเทคนิคการอัดคลายแรงดันมีคุณสมบัติทางด้านความร้อนสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ได้จากวิธีการปั่นกวน

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 ในการสกัดคอลลาเจนด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง ควรเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันให้ถี่มากขึ้น เช่น อัดคลายแรงดัน 6 รอบต่อชั่วโมง ซึ่งอาจจะส่งผลให้ได้ปริมาณคอลลาเจนที่เพิ่มสูงขึ้น

6.2.2 ควรเพิ่มการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง โดยเพิ่มตัวแปรที่ศึกษา เช่น แรงดัน และเพิ่มเวลาในการสกัด

เอกสารอ้างอิง

[1] Bailey, A. J. and Light, N. D. (1989). Connective Tissue in Meat and Meat Product. **Elsevier Sciences Publishers,** London.

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

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

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

[5] Prasertsung, I., Kanokpanont, S. Bunaprasert, T., Thanakit V. and Damrongsakkul, S. (2007). Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. **Wiley InterScience,** 10, 210–219.

[6] Jose, J. and Harrington, W. F. (1964). Role of pyrrolidine in structure and stabilization of collagen. **J.Molecular Biol,** 9, 267-287.

[7] Friess, W. (1998). Collage–biomaterial for drug delivery. **Eur. J. Phar. and Biophar,** 45, 113-136.

[8] นันทพรอัคนิจ. (2550). **การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกุดและลักษณะบางประการของคอลลาเจนที่สกัดได้.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.**

[9] William, S. K., et, al. (2005).**Concept of genetics,** Prentice Hall.

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

[11] Foegeding, E. A., Lanier, T. C. and Hultin, H. O. (1996). Characteristics of Edible Muscle Tissues. **Food Chemistry,** 35, 879-942.

[12] Muyonga, J., Cole, C.G.B., Duodu, K.G. (2003). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (Latesniloticus). **Food Chem,** 85, 81-89.

[13] Lin, Y. K. and Liu, D. C. (2004). Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. **Food Chem,** 94, 621-625.

[14] Pipatcharoenwong, C., Garnjanagoonchorn, W. and Jirapakkul, W.(2006). Collagen Extraction of Red Snapper (Lutjanusargentimaculatus). **Food Chem,** 169, 30-44.

[15] Ahmad, M., Benjakul, S. (2009).Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (Aluterus monocerous). **Food Chemistry,** 120, 817–824.

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

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

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

[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.

[20] Su, D., Wang C., Cai, S., Mu, C., Li, D. and Lin, W. (2012).Influence of palygorskite on thestructure and thermal stability of collagen. **Applied Clay Science,** 41–46.

ภาคผนวก ก
ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ก.1 แสดงปริมาณการกำจัดไขมัน

Sample	น้ำหนักเริ่มต้น (g)	น้ำหนักสุดท้าย (g)	น้ำหนักที่หายไป (g)	ร้อยละการกำจัดไขมัน
1	10.67	5.41	5.26	49.30
2	10.67	6.1	4.57	42.83
3	10.67	6.1	4.57	42.83
		ค่าเฉลี่ย	4.800	44.99
		SD	0.398	0.037

ตารางที่ ก.2 แสดงการคำนวณปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้

	เวลา (hr)	น้ำหนักเริ่มต้น (g)	น้ำหนักสุดท้าย (g)	ร้อยละของคอลลาเจนที่สกัดได้
ปั่นกวน	6	6.66	0.7535	11.31381
	12	6.66	0.8619	12.94144
	24	6.66	0.9981	14.98649
อัดแรงดัน 2 รอบ	6	6.66	0.8208	12.32432
	12	6.66	1.1908	17.87988
	24	6.66	1.8373	27.58709
อัดแรงดัน 4 รอบ	6	6.66	0.9525	14.3018
	12	6.66	1.2874	19.33033
	24	6.66	1.8819	28.25676