สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระดับการประเมินคุณภาพ

- [ ] ดีเยี่ยม
- [x] ดีมาก
- [ ] ดี
- [ ] ปานกลาง

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ๘๕
แม่โจ้ ๒๔๗๗
MAEJO UNIVERSITY

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

คลอลาเจนในเศษเหลือปลาจีน (Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*)
จากกระบวนการผลิตปลาส้ม

น้ำเพชร ประกอบศิลป์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง
สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง

ชื่อเรื่อง

คอลลาเจนในเศษเหลือปลาจีน (Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*)
จากกระบวนการผลิตปลาส้ม

โดย

น้ำเพชร ประกอบศิลป์

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประจวบ ฉายบุ)
วันที่...29...เดือน...ธค...พ.ศ. ...51...

กรรมการที่ปรึกษา ....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)
วันที่...25...เดือน...ธค...พ.ศ. ...2551...

กรรมการที่ปรึกษา ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชนกันต์ จิตมนัส)
วันที่...29...เดือน...ธ.ค....พ.ศ. ...51...

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัญญัติ มนเทียรอาสน์)
วันที่...29...เดือน...ธ.ค....พ.ศ. ...2551...

สำนักงานบัณฑิตศึกษารับรองแล้ว ....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช)
ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา
วันที่...30...เดือน...ธ.ค....พ.ศ. ...2551...

ชื่อเรื่อง	คลอลาเจนในเศษเหลือปลาจีน (Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*) จากกระบวนการผลิตปลาส้ม
ชื่อผู้เขียน	นางสาวน้ำเพชร ประกอบศิลป์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประจวบ ฉายบุ

บทคัดย่อ

การศึกษาความเป็นไปได้ในการสกัดคลอลาเจนจากเศษเหลือปลาจีน (*Hypophthalmichthys molitrix*) จากกระบวนการผลิตปลาส้ม พบว่าการสกัดคลอลาเจนจากเกล็ด หนังและกระดูกให้ผลผลิต 46.40 ± 3.69, 42.78 ± 2.43 และ 243.14 ± 5.42 มิลลิกรัม/100 กรัม ของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟลิซิสของคลอลาเจนจากเกล็ด หนังและกระดูกพบว่าเป็นคลอลาเจน ชนิด Type I กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลักในเกล็ดคือ Leucine และ Lysine ในหนัง คือ Glycine และในกระดูก คือ Proline และ Lysine และกรดอะมิโนหลักในคลอลาเจนที่สกัดได้เป็นกรดอะมิโนแบบไม่จำเป็น ค่าความคงตัวของคลอลาเจนเมื่อพิจารณาจากค่า Imino acid พบว่าคลอลาเจนที่สกัดได้จากกระดูกให้ค่าความคงตัวที่ดีที่สุด รองมาคือเกล็ดและหนังตามลำดับ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะสกัดคลอลาเจนจากเศษเหลือปลาจีน เป็นอีกทางหนึ่งของคลอลาเจนอันนำไปสู่การลดปริมาณของเสียจากอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำ

Title	Collagen in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by-product from fermented fish processing
Author	Miss Numpet Prakobsin
Degree of	Master of Science in Fisheries Technology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Prachaub Chaibu

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the possibility to extract collagen from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by – product derived from fermented fish processing. Collagen extraction from scale, skin and bone collagens yielded 46.40 ± 3.69, 42.78 ± 2.43 and 243.14 ± 5.42 mg/100g on the basis of wet weight, respectively. Similar electrophoresis patterns of scale, skin and bone collagens were observed and the extracted collagen was classified as type I collagen. Leucine and lysine are major amino acid components in scale, glycine in skin and, proline and lysine in bone. The major content of these extracted collagen consisted of non – essential amino acid. As the percentage terminal stability of collagen is related to the content of imino acid (proline and hydroxyproline), collagen from bone was found TO contain the highest imino acid content, followed by collagen from scale and skin, respectively. Therefore, extraction of collagen from silver carp by-product could be an alternative source that subsequently is able to minimize solid wastes from fish processing industries.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประจวบ ฉายบุ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ซึ่งให้ความกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา อนุเคราะห์สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำวิทยานิพนธ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพันและผู้ช่วยศาสตราจารย์ชนกันต์ จิตมนัส กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา เอกสารทางวิชาการ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ อุปกรณ์คอมพิวเตอร์และตรวจแก้ไขจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คุณสมศักดิ์ ทะระถา หัวหน้าห้องปฏิบัติการโลหะหนัก ห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร ที่ให้ความกรุณาให้ความรู้และคำเนินการวิเคราะห์กรดอะมิโน ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุน Professor Dr. Keinosuke Maeda เพื่อใช้ในการทำการวิจัยผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบพระคุณ คุณพ่อชนา - คุณแม่บัวผัด ประกอบศิลป์ คุณชัยวัฒน์ คีรีวรรณ และญาติพี่น้องที่เป็นแรงกาย แรงใจในการทำงานสำหรับผู้เขียนทุกท่าน

น้ำเพชร ประกอบศิลป์

ธันวาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(9)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
คลอลาเจน (Collagen)	3
การจำแนกคลอลาเจน (Classification of collagen)	3
องค์ประกอบของคลอลาเจน (Composition of collagen)	6
เส้นใยคลอลาเจน (Collagen fibers)	8
การสังเคราะห์คลอลาเจน	9
การสกัดคลอลาเจนและการทำให้บริสุทธิ์	9
คลอลาเจนในสัตว์น้ำ (Collagen in aquatic animals)	11
คลอลาเจนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Collagen in invertebrates)	13
คลอลาเจนในปลา (Collagen in fish)	13
คุณสมบัติของคลอลาเจน	16
ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของคลอลาเจน (The factors affecting collagen properties)	20
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	24
วัตถุดิบ	24
สารเคมี	24
อุปกรณ์	25

หน้า

วิธีดำเนินการวิจัย 26
การสกัดคลอลาเจน 26
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 27
การ Hydrolysis ตัวอย่างคลอลาเจนสกัด 28
การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ GC-MS 28
บทที่ 4 ผลการศึกษาและการวิจารณ์ 29
ผลการสกัดคลอลาเจน 29
SDS-PAGE Pattern ของคลอลาเจน 31
การศึกษา Amino acid Profiles ของคลอลาเจน 33
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา 37
บรรณานุกรม 38
ภาคผนวก 43
ภาคผนวก ก เศษเหลือปลาจีนและการสกัดคลอลาเจน 44
ภาคผนวก ข ประวัติผู้เขียน 48

MAEJO UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปริมาณของคลอลาเจนในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	3
2	ชนิดและแหล่งที่พบคลอลาเจนในเนื้อเยื่อของสัตว์	5
3	ชนิดของกรดอะมิโนในกล้ามเนื้อของปลาทะเลและจากสัตว์มีกระดูกสันหลัง	12
4	ปริมาณคลอลาเจนที่พบในกล้ามเนื้อของปลาชนิดต่างๆ	14
5	ปริมาณและผลผลิตจากการสกัดคลอลาเจนจากเนื้อเยื่อของเศษปลาเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาส้ม 3 ชนิด คือ เกล็ด หนัง และกระดูก	29
6	ปริมาณกรดอะมิโนที่พบในคลอลาเจนสกัดในเศษเหลือปลาจีน (*Hypophthalmichthys molitrix*) จากกระบวนการผลิตปลาส้ม	36

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	Collagen molecule	7
2	Collagen fiber	8
3	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดอะมิโน (Proline+hydroxyproline) และปริมาณการละลายตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของคลอลาเจนจากสัตว์ที่ต่างชนิดกัน	22
4	SDS-PAGE Pattern ของ Protein marker (M) คลอลาเจน Type I (1) เกล็ด (2) หนัง (3) และกระดูก (4) จากเศษเหลือปลาจากกระบวนการผลิตปลาส้มของเกษตรกรกลุ่มผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา	32
5	ผลการศึกษา SDS-PAGE ของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสีกูด โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เปปซิน 0.1 % (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสัดส่วนของปริมาณหนังต่อกรดตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:50 แล้วทำการตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.9 โมลาร์ (M:standard marker proteins; C:calf skin collagen;N:collagen ectracted at 4°C)	33
6	เศษเหลือปลาจีนจากกระบวนการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้ม อ.เมือง จ.พะเยาที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดคลอลาเจนจากส่วนต่าง ๆ คือ (a) เกล็ด (b) หนัง และ (c) กระดูก	45
7	การสกัดคลอลาเจนจากเกล็ดปลาจีนเศษเหลือจากการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา	46
8	การสกัดคลอลาเจนจากหนังปลาจีนเศษเหลือจากการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา	46
9	เครื่องสำหรับการศึกษา SDS-PAGE ของคลอลาเจนที่สกัดได้จากเศษเหลือปลาจีนจากการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา	47
10	เครื่อง GC-MS ที่ใช้ในการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ด หนัง และกระดูก เศษเหลือปลาจีนจากการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา	47

บทที่ 1
บทนำ

อุตสาหกรรมด้านการเลี้ยงสัตว์น้ำและการแปรรูปสัตว์น้ำเป็นธุรกิจที่มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะเดียวกันก็มีของเหลือทิ้งที่เป็นของเสียจากการแปรรูป ไม่ว่าจะเป็นเกล็ดปลา หนังปลา กระดูกหรือส่วนของอวัยวะภายในที่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งทั้งหมดเป็นของเสียที่สร้างปัญหาให้กับสิ่งแวดล้อม สร้างกลิ่นไม่พึงประสงค์ เป็นแหล่งสะสมของแมลงต่าง ๆ ถ้าหากไม่มีการบริหารจัดการที่ดี นอกจากนี้กระบวนการผลิตและแปรรูปสัตว์น้ำชนิดยังคงมีการสูญเสียในกระบวนการผลิต การเก็บเกี่ยว และการแปรรูปในสัดส่วนค่อนข้างสูง กลายเป็นการสูญเสียที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงไปด้วย และไม่คุ้มค่าในการลงทุน ดังนั้นเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตหรือการแปรรูปสัตว์น้ำให้สามารถแข่งขันได้ในระยะต่อไป จำเป็นต้องให้ความสำคัญกับการสร้างมูลค่าเพิ่มของสัตว์น้ำโดยใช้ประโยชน์จากทุกส่วนหรือใช้ให้มากที่สุด เพื่อให้เกิดความคุ้มค่าในการลงทุนและนำไปสู่การลดต้นทุนการผลิต ซึ่งระบบการผลิตสัตว์น้ำหรือการอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำควรที่จะพิจารณานำแนวทางการเพิ่มมูลค่าโดยใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบทุกส่วนหรือ Zero Waste Industry มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด (สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2551)

นพวรรณ และคณะ (2548) กล่าวว่า เศษปลาที่เหลือจากการแปรรูปอาหารแช่แข็งสามารถนำมาใช้ทดแทนปลาป่นเพื่อเป็นอาหารสัตว์ได้ Nagai and Suzuki (2000) ศึกษาการแยกคลอลาเจนจากหนัง กระดูกและครีบของปลาทะเลที่เป็นเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือของปลาจากการแปรรูปมาสกัดเป็นคลอลาเจนนอกจากจะเพิ่มมูลค่าของปลาแล้วยังสามารถช่วยลดต้นทุนในการกำจัดของเสียได้

คลอลาเจนเป็นสารพวกโปรตีนที่มีการใช้ประโยชน์กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรม เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมยา เช่น ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไส้สังเคราะห์สำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอก ใช้เป็นฟิล์มเคลือบเงาอาหาร ใช้ในการผลิตคอนแทคแลนส์ชนิดอ่อน ใช้ในการผ่าตัดตกแต่งผิวหนัง การศัลยกรรมความงาม การชะลอความแก่หรือการลดรอยเหี่ยวย่นของผิวหนังได้ (Walter *et al.*, 1998) คลอลาเจนที่ใช้กันในปัจจุบันนี้เป็นคลอลาเจนที่สกัดได้จากหนังวัวและหนังหมูเป็นลำดับต้น ๆ ซึ่งในสัตว์ทั้งสองชนิดนี้มักจะมีปัญหาเรื่องของสารเร่งเนื้อแดง สารเร่งการเจริญเติบโต ยาปฏิชีวนะ และเรื่องของโรคระบาดต่าง ๆ รวมทั้งข้อจำกัดในการใช้เนื่องจากอิทธิพลทางศาสนา (Sadorska *et al.*, 2003) การสกัดคลอลาเจนจากปลาสามารถสกัดได้ทั้งกระดูก เกล็ด กล้ามเนื้อ และหนัง Toshiyuki *et al.* (2003) กล่าวว่า เกล็ดปลา

นิลสามารถสกัดคลอลาเจนได้ถึง 33.6% ของปริมาณเกล็ดที่ใช้ทั้งหมด และจากรายงานของ Takeshi and Nobutuka (2000) พบว่าการสกัดคลอลาเจนจากเศษเหลือของปลาโดยใช้หนัง กระดูก และครีบให้เปอร์เซ็นต์คลอลาเจนสูงถึง 36% - 54% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณคลอลาเจนที่มีอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของปลามีปริมาณที่สูงมาก สอดคล้องกับรายงานของ Phanat (2004) ที่ได้ศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติของคลอลาเจนที่สกัดได้จากหนังและกระดูกปลาตาหวานที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมซูริมิ พบว่าคลอลาเจนที่สกัดได้ให้ผลผลิตร้อยละ 37.94 และ 29.1 ของน้ำหนักเปียก โดยรูปแบบโปรตีนสามารถจำแนกได้เป็นคลอลาเจนชนิด Type I ซึ่งเป็นคลอลาเจนที่มีประสิทธิภาพสูงเป็นที่ต้องการของตลาดอุตสาหกรรมอาหารและความงาม แล้วยังเป็นคลอลาเจนที่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากเป็นอันดับต้นๆ (Morimura, 2002) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานของการใช้ของเสียจากผลิตภัณฑ์พื้นบ้านเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มในการสกัดคลอลาเจน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงชนิดและปริมาณของคลอลาเจนที่สกัดจากเศษเหลือผลิตภัณฑ์พื้นบ้าน และเป็นอีกแนวทางการผลักดันการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับสัตว์น้ำในรูปแบบ Zero Waste Industry รวมทั้งเป็นทางเลือกการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งเพื่อประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาปริมาณของคลอลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ด หนังและกระดูกของปลาจีนจากกระบวนการผลิตปลาส้ม
2. เพื่อศึกษาชนิดของคลอลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ด หนังและกระดูกของปลาจีนจากกระบวนการผลิตปลาส้ม
3. เป็นแนวทางการเพิ่มมูลค่าสัตว์น้ำเพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้ง โดยนำมาแปรรูปเพื่อเพิ่มคุณค่า
2. ทราบถึงชนิดและปริมาณของคลอลาเจนที่สกัดได้จากเศษเหลือของสัตว์น้ำ
3. เพื่อเป็นแนวทางในการนำคลอลาเจนที่สกัดได้ไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

คลอลาเจน (Collagen)

คลอลาเจนเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนมีอยู่ในสัตว์ทุกชนิดเนื่องจากเป็นส่วนประกอบสำคัญในกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เอ็น กระจกตา ผิวหนัง กระดูกอ่อน เป็นต้น ซึ่งในร่างกายสัตว์แต่ละชนิดจะมีคลอลาเจนประมาณ 1 ใน 3 ของโปรตีนทั้งหมดในร่างกาย (Foegeding *et al.,* 1996; Noitup, 2004) ตัวอย่างเช่น เนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีคลอลาเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ

ตาราง 1 ปริมาณของคลอลาเจน (Collagen) ในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

เนื้อเยื่อ	Collagen (%)
เอ็น (Tendon)	95
หนัง (Skin)	50
ระบบท่อลำเลียง (Vascular system)	40
กระดูก (Bone)	25
ปอด (Lung)	15
ไต (Kidney)	4
ตับ (Liver)	2
กล้ามเนื้อ (Muscle)	2

ที่มา : Bailey and Light (1989)

การจำแนกคลอลาเจน (Classification of Collagen)

คลอลาเจนสามารถจำแนกออกได้เป็น 11 กลุ่มตามความแตกต่างขององค์ประกอบของคลอลาเจน (Swan and Torley, 1991) โดยแต่ละคลอลาเจนแต่ละชนิดจะมีขนาดของ Triple

helical regions ซึ่งเป็นขนาด และ extent ของ N- and C- propeptides (Globular domains) นอกจากนี้คลอลาเจนยังสามารถจำแนกได้เป็น กลุ่มตามขนาดของโมเลกุล

Group I	stristed fibrous collagens (Types I - III)
Group II	non fibrous collagens (Types IV)
Group III	microfibrillar fibrous collagens (Types V - XI)

ตาราง 2 ชนิดและแหล่งที่พบคลอลาเจนในเนื้อเยื่อของสัตว์

Type	Molecular Length (nm)	Retained terminal Globular domains	Molecular composition	Macromolecular structure	Localization
I	300	Processed	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ or$[\alpha 1(I)]_3$ $[\alpha 1(I)\alpha 2(I)\alpha 3(I)]$	Striated fiber	skin, tendon, bone, dentine
II	300	Processed	$[\alpha 1(II)]_3$	Striated fiber	cartilage, vitreous humor
III	300	Processed	$[\alpha 1(III)]_3$	Striated fiber	vascular system, skin, muscle
IV	390 – 420	C – terminal	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ or$[\alpha 1(IV)]_3$	Nonfibrous	basement membranes
V	300	N – terminal	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ or$[\alpha 1(V)]_3$	Microfibrillar	embryonic tissue, skin, vascular system
VI	105 – 150	N– and C- terminal	$[\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\ \alpha 3(VI)]$or $[\alpha 1(VI)]_3$	Microfibrillar	vascular system
VII	450	Not Know	$[\alpha 1(VII)]_3$	Microfibrillar	skin, amniotic membrane
VIII	Not Know	Not Know	$[\alpha 1(VIII)]_3$	Not Know	aortic endothelium
IX	200	N – terminal	$[\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)]$	Microfibrillar	cartilage
X	150	C – terminal	$[\alpha 1(X)]_3$	Microfibrillar	cartilage
XI	300	Not Know	$[\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)]$	Microfibrillar	cartilage

ที่มา: Bailey (1989); Noitup (2004)

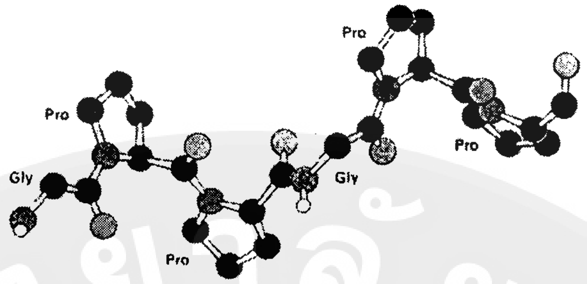
คลอลาเจน Type I เป็นโปรตีนที่พบมากในผิวหนัง ประมาณ 80% , เส้นเอ็นประมาณ 90%,เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูกประมาณ 90% แล้วยังเป็นคลอลาเจนที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมความงามและเครื่องสำอางต่างๆ (Kimura *et al.*, 1998; Noitup, 2004) นอกจากนี้ในสัตว์ที่ออกลูกเป็นไข่โดยส่วนของเปลือกไข่จะมีเยื่อเปลือกไข่เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก และเยื่อเปลือกไข่มีคลอลาเจนประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนัก (MacNeil, 2001) โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยคลอลาเจน Type I, V และ X (Candis, 1991)

องค์ประกอบของคลอลาเจน (Composition of collagen)

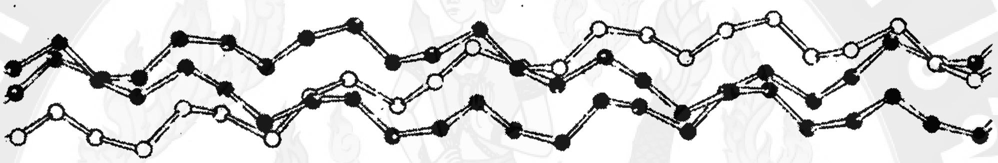
คลอลาเจนเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งลักษณะเป็น Fibrous supramolecular รูปร่างทรงกระบอก ความยาวประมาณ 2800 ^{O}A และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 – 15 ^{O}A (Foegeding *et al.*, 1996) ลักษณะเป็น three polypeptide chains (call chains) แต่ละพันธะจับกันแบบสลับซ้ายและขวา จำนวน 3 สาย ที่เรียกว่า Triple helix โดยมวลโมเลกุลของแต่ละสายประมาณ 100,000 Delton ซึ่งมวลโมเลกุลของคลอลาเจนประมาณ 300,000 Delton ลักษณะการจับของแต่ละพันธะจะจับด้วยพันธะไฮโดรเจน(Foegeding *et al.*, 1996) อีกหนึ่งลักษณะที่สำคัญและเป็นลักษณะเฉพาะของคลอลาเจนแต่ละโมเลกุลประกอบด้วย ดังนี้

-Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Leu-Hyp-

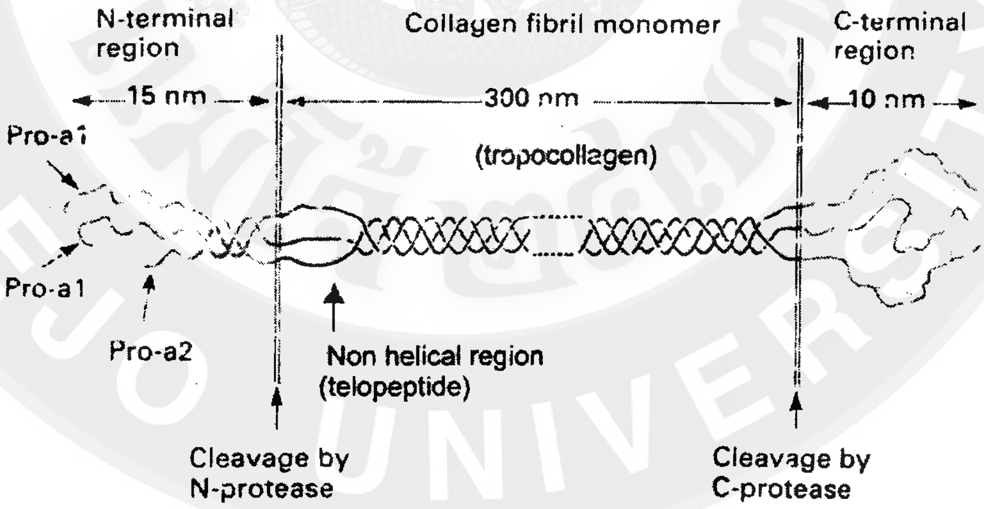
กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนสามารถจำแนกได้เป็นกรดอะมิโนแบบ non-essential ได้แก่ glycine, proline, hydroxyproline and alanine แบบ essential ได้แก่ methionine, tyrosine, cysteine,trytophan and histidine โดย cysteine พบได้ในคลอลาเจน Type III และ Type IV (Xiong, 1997 : Paweena, 2004) ด้วยเหตุนี้ทำให้คลอลาเจนชนิดที่มีกรดอะมิโนแบบ essential เพียงครึ่งหนึ่งจึงเรียกว่า non – collagenous protein (Swand and Torley, 1991) โดยทั่วไปแล้วคลอลาเจน 1 สาย จะประกอบด้วย Glycine 33%, proline 1%, alanine 11% และ hydroxyproline 11% ส่วนที่เหลือเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ตาม Type ของคลอลาเจน โดย hydroxyproline สามารถจำแนกชนิดของโปรตีนได้ว่าเป็นคลอลาเจนเนื่องจาก hydroxyproline สามารถพบได้ในโปรตีนที่เป็นคลอลาเจนและอีลาสติน โดยทั่วไปแล้ว elastin มี hydroxyproline อยู่เพียง 2% เท่านั้น



a) Single strand of the collagen triple helix.



b) Triple-stranded collagen helix (shown only C-atom).

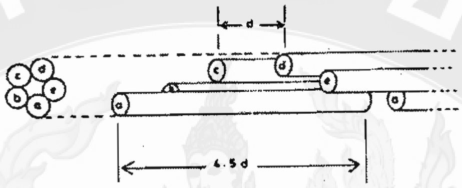


c) The procollagen molecule consists of globular, non-helical and helical section.

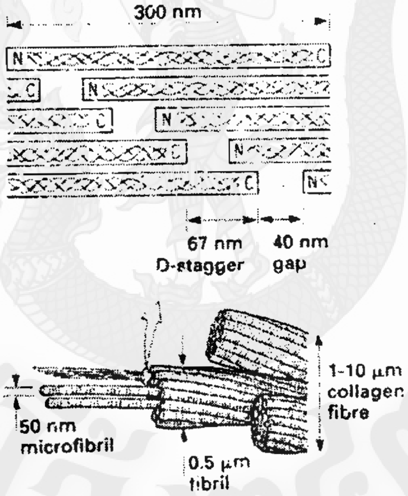
ภาพ 1 Collagen molecule (Wong, 1989)

เส้นใยคลอลาเจน (Collagen fibers)

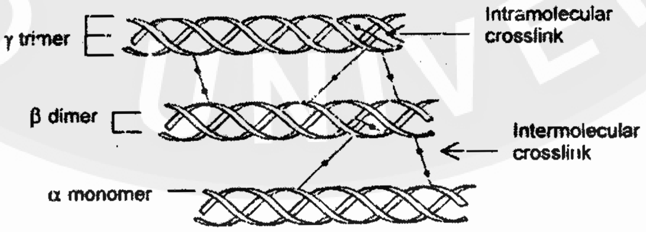
คลอลาเจนเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลของ Tropocollagen ซึ่งเป็นเส้นใยขนาดเล็ก (microfibril) ประมาณ 67 nm (= Delton stagger) ส่วนน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 4.5 Delton/เส้นใย ที่ความยาว 300 nm microfibril 5 โมเลกุลประกอบรวมกันเรียกว่า Pentafibril จำนวน 1 unit



a) Pentafibril model of collagen fiber structure.



b) Collagen fibers are strengthened by crosslinks.



c) Collagen molecular crosslink.

ภาพ 2 Collagen fiber (Wong, 1989)

การสังเคราะห์คลอลาเจน

สายคลอลาเจนจะถูกสังเคราะห์บนไรโบโซมในไฟโบรบลาสเซลล์ที่เปรียบเสมือนเป็นตัวเริ่มต้นที่ค่อนข้างยาว ซึ่งเรียกว่า "โปรคลอลาเจน" กับส่วนที่เรียกว่า "Globular Extension" ที่ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ประมาณ 200 หน่วย ตรงบริเวณปลายทั้ง 2 ข้าง (ปลาย N และ C) สายโปรคลอลาเจนโพลีเพปไทด์เหล่านี้จะถูกขนส่งเข้าไปในลูเมนของเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัมชนิดหยาบ ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันและการดัดแปลงทางเคมีต่าง ๆ แล้วรวมตัวกันกลายเป็น Triple Chain Molecules ก่อนที่จะเกิดเป็นโครงสร้าง Triple Chain จะเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสายเรียงกันเป็น 3 สาย หลังจากที่โมเลกุลของคลอลาเจนถูกปล่อยออกจากไฟโบรบลาสเซลล์ โปรเพปไทด์จะถูกตัดออกโดยเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาเอนไซม์ ท่อนโปรเพปไทด์ทั้งสองจะปล่อยให้ Triple Chain Molecules ที่เรียกว่า "โทรโปคลอลาเจน" เกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรส์กลายเป็นเส้นใยที่มีความยาวหลายไมครอนและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 – 200 นาโนเมตร เส้นใยเล็ก ๆ เหล่านี้จะผนวกกันเข้าในแนวขนานจนกลายเป็นเส้นใยคลอลาเจน โดยมีกรดแอสคอบิกทำหน้าที่สำคัญในการสร้างคลอลาเจน ดังนั้นการขาดวิตามินซีจะทำให้โปรลีนไม่สามารถถูกไฮดรอกซีเลทกลายเป็นไฮดร็อกซีโปรลีนได้ นั่นคือปฏิกิริยาการสังเคราะห์คลอลาเจนจะหยุดชะงัก (Plasticsurgery, 2002)

การสกัดคลอลาเจนและการทำให้บริสุทธิ์

การเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่แยกออกมาจากเนื้อเยื่อและเนื้อเยื่อไขมันจะต้องล้างเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ปนเปื้อนมากับเนื้อเยื่อแล้วนำไปแช่ในสารละลายด่าง เพื่อทำลายสารเคมีที่เกาะยึดติดอยู่กับคลอลาเจน โดยด่างจะกระทำต่อบริเวณ non-helical telopeptide และกำจัดส่วนที่เชื่อมติดอยู่ออกไป รวมทั้งยังทำให้ส่วนที่ไม่ใช่คลอลาเจน ได้แก่ keratin, globulin,mucopolysaccharides, elastin, mucins และ albumins บางครั้งก็รวมทั้งสารคัดหลั่งเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตที่สามารถละลายได้มากยิ่งขึ้น ส่วนไขมันที่ยังปรากฏอยู่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตที่มีขั้ว และถูกกำจัดออกไปเมื่อถูกล้างด้วยน้ำเย็นที่ไหลผ่านในขั้นต่อไป การล้างขั้นสุดท้ายมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดสารละลายด่างส่วนเกินออกไป หลังจากการพรีทรีตเมนท์ด้วยด่างแล้ว เส้นใยคลอลาเจนจะเกิดการเกาะตัวกันภายในและมีสภาพเส้นใยลดลง การล้างด้วยด่างที่ยาวนานเกินไปจะทำให้โครงสร้าง Triple helical และสภาพเส้นใยถูกทำลาย ทำให้ได้โพลีเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำและสูญเสียปริมาณผลได้

คลอลาเจน (Ockman and Hansen, 2000) วัตถุดิบที่ล้างและพรีทรีตท์แล้วจะถูกนำไปสู่ขั้นตอนการสกัดทันที

การแยกคลอลาเจน

ในอดีตคลอลาเจนถูกพิจารณาว่าเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถละลายได้ อย่างไรก็ตาม ในปี 1900 นักวิจัยหลายท่านแสดงให้เห็นว่าคลอลาเจนสามารถละลายได้ดีในสารละลายกรดอะซิติกเจือจาง ต่อมาสภาวะต่าง ๆ ถูกสำรวจเพื่อการทำละลายคลอลาเจน เช่น การปรับ pH และความเข้มข้นของเกลือในตัวกลางการสกัด ส่วนมากแล้ววิธีการสกัดแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ 1) การสกัดด้วยสารละลายเกลือความเข้มข้นต่ำในสภาพ pH 2 – 4 ผลผลิตจากการสกัดถูกพิจารณาว่าเป็นคลอลาเจนที่ละลายได้ในกรด 2) การสกัดที่กระทำในสภาพที่มีค่า pH ใกล้เคียงกับ 7 ในสารละลายเกลือความเข้มข้นสูง ผลผลิตที่ได้เรียกว่าคลอลาเจนที่สามารถละลายได้ในเกลือที่เป็นกลาง (Asghar and Henrickson, 1982)

มีคลอลาเจนในเนื้อเยื่อแก่จำนวนน้อยมากหรือแทบไม่มีเลยที่สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือที่เป็นกลาง (เช่น 1 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.4) อย่างไรก็ตามมีเพียงคลอลาเจนที่ไม่เกาะยึดปริมาณเล็กน้อยเท่านั้นที่สามารถถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดใหม่บดละเอียด คลอลาเจนจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแก่ เช่น หนัง หรือ รกที่สามารถถูกทำให้ละลายได้ในการสกัดด้วยสารละลายกรดเจือจาง เช่น 0.5 M acetic acid ที่ 4 ^{0}C ที่อุณหภูมินี้สามารถทำให้ได้คลอลาเจน Type I ในปริมาณมาก ขณะที่ Type III, IV, และ V นั้นไม่มีผลเป็นอย่างมากและมีส่วนที่ไม่ละลายเหลืออยู่ (Bailey and Light, 1989) และคลอลาเจน Type I บริสุทธิ์สามารถแยกได้โดยการแยกชั้นเกลือต่างกันเป็นขั้น ๆ การศึกษาของ Kimura *et al.* (1988) รายงานว่าคลอลาเจน Type I ที่ถูกสกัดจากหนังด้วย 0.5 M acetic acid เป็นเวลา 24 ชม. ทำให้ตกตะกอนด้วย 0.6 – 0.8 M NaCl ทำการแยกผ่านเยื่อบาง ๆ Nagai and Suzuki (2000) รายงานว่า วิธีการสกัดคลอลาเจน Type I จากหนังปลาหลายชนิดและคุณสมบัติเกี่ยวกับความร้อน คลอลาเจนจะถูกสกัดโดย 0.1N NaOH เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คลอลาเจน และ 10% Butyl alcohol เพื่อกำจัดไขมัน แช่ 0.5 acetic acid เป็นเวลา 3 วัน เพื่อการสกัดคลอลาเจน Type I และ กำจัดเกลือออก ด้วย 0.9 M NaCl

นอกจากนี้คลอลาเจนยังสามารถถูกสกัดได้โดยเอนไซม์เปปซินด้วยเหมือนกัน โดยเอนไซม์โปรติเอสนี้จะไปช่วยปลดปล่อยโมเลกุลคลอลาเจนที่สามารถละลายได้จากส่วนโครงสร้างที่ไม่สามารถละลายได้ วิธีการสำหรับเทคนิคนี้จะใช้สัดส่วนของซับเตรทต่อเอนไซม์เท่ากับ 10 : 1 (โดยน้ำหนักเปียก) ที่อุณหภูมิ 4 – 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-72 ชั่วโมง ส่วน

คลอลาเจนที่ไม่ละลายที่เหลืออยู่นั้นสามารถเตรียมได้โดยการบดตัวอย่างให้ละเอียดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน 0.5 M acetic acid ที่ประกอบด้วยยูเรียความเข้มข้น 8 โมลาร์ (Bailey and Light, 1989) Vasantra *et al.* (1988) ใช้ 0.001 M HCl สำหรับการทรีตด้วยเปปซิน ในสัดส่วนของเอ็มไซม์ต่อคลอลาเจนเท่ากับ 1 : 400 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน Yata *et al.* (2001) สกัดคลอลาเจนโดยการบดกับ NaOH 0.1 นอร์มอล จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจากนั้นปล่อยให้หนังปลาแขวนลอยในในกรดอะซิติก 0.5 โมลาร์ ในสัดส่วนของเอนไซม์ต่อซับสเตรท เท่ากับ 1/1000 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 24 ชม. ที่ 5 องศาเซลเซียส จากนั้นคลอลาเจนจะถูกกำจัดเกลือออกไปโดยการเติม NaCl จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 โมลาร์

สารละลายกรดที่เจือจางแล้วจะต้องมีความเข้มข้นไม่เกินกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และ pH ประมาณ 2 – 4 ซึ่ง pH ระดับนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้คลอลาเจนขยายตัวและมีการละลายได้ดีขึ้น ขณะที่ค่าไอโซอิเล็กทริกพอยท์ของโปรตีนที่ไม่ใช่คลอลาเจนบางตัวมีค่าใกล้เคียงกับ pH 4 ซึ่งจะทำให้ละลายได้น้อยที่สุดและเกาะตัวกันเป็นก้อนระหว่างการการสกัด (Ockerman and Hansen, 2000) ส่วนคลอลาเจนชนิดต่าง ๆ โดยทั่วไปจะถูกแยกออกจากสารละลายใสส่วนบนหลังจากการสกัดด้วยกรดหรือเปปซิน โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ คลอลาเจนต่างชนิดกันจะถูกกำจัดเกลือออกจากสารละลายในรูปของตะกอน ตะกอนที่ได้สามารถนำไปละลายได้อีกครั้งในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วจึงทำการแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

คลอลาเจนในสัตว์น้ำ (Collagen in aquatic animals)

คลอลาเจนเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลักของกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อต่างๆ และยังเป็นส่วนประกอบของโปรตีนทั้งหมดที่พบในร่างกายของสัตว์ ปลาเป็นสัตว์น้ำที่มีคลอลาเจนสูงกว่าสัตว์ชนิดน้ำอื่นๆ เนื่องจากปลามีส่วนประกอบของร่างกายที่เป็นโปรตีนอยู่ทุกส่วนของร่างกาย เช่น เกล็ด ครีบ ผิวหนัง กระดูกแข็งและกระดูกอ่อน เป็นต้น นอกจากนี้ปลายังเป็นสัตว์น้ำที่มีการเคลื่อนที่ตลอดเวลาทำให้ระบบการเรียงตัวของกล้ามเนื้อมีความแข็งแรงและเรียงกันเป็นระเบียบมีความหนาแน่นสูง (Regenstein and Regenstein, 1991) ปลาแต่ละชนิดมีกล้ามเนื้อที่แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดจึงทำให้ปริมาณคลอลาเจนนั้นมีความแตกต่างกันไปด้วย เช่น ปลา cod มีปริมาณคลอลาเจน 2% ของน้ำหนักตัว ปลาฉลามมีปริมาณคลอลาเจน 10% ของน้ำหนักกล้ามเนื้อทั้งหมด (Regenstein and Regenstein, 1991) โดยทั่วไปกล้ามเนื้อของปลามีโปรตีนอยู่ทั้งหมด 1% – 1.2% โดยอยู่ในส่วนของเนื้อ 0.2% - 2.2% และเป็น Collagen nitrogen ในหนังปลา 1.7% - 4.6% (Sidorski *et al.,* 1990) กล้ามเนื้อและหนังของปลามีความแตกต่างของระดับคลอลาเจนอย่างเห็นได้

ชัด เนื่องจากระดับความแตกต่างของระดับกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้ง 7 ตัว และความเข้มข้นของ Hydroxyproline

ตาราง 3 ชนิดของกรดอะมิโนในกล้ามเนื้อของปลาทะเลและจากสัตว์มีกระดูกสันหลัง

Amino acid	Residues per 1000 residues			
	ปลา Cod	หมึก (Squid)	กุ้ง (Lobster)	วัว
Alanine	106.0	88.8	43	107
Arginine	59.1	59.0	57	45
Aspartic acid	42.3	57.7	47	34
Cystine	-	1.8	0	-
Glutamic acid	82.2	86.4	102	83
Glycine	313.6	308	324	336
Histidine	16.3	7.4	7	5
Hydroxyproline	40.7	89.3	90	109
Hydroxylysine	8.2	16.1	24	8
Isoleucine	18.6	20.9	20	12
Leucine	32.3	33.9	46	25
Lysine	36.9	15.3	45	23
Methionine	20.4	7.7	12	5
Phenylalanine	14.5	11.5	8	14
Proline	87.6	96.0	108	113
Serine	62.9	46.9	49	36
Threonine	25.8	26.2	24	17
Tyrosine	6.0	4.5	4	3
Valine	26.1	21.1	20	25

ที่มา : Sidorska *et al.* (1990)

คลอลาเจนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Collagen in invertebrates)

ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังแต่ละชนิดมีคลอลาเจนที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ เช่น Homotrimetic collagen molecules $(\alpha 1)_3$ พบได้ใน *Haliotis discus* และ*Turbo cornutus* โดยแตกต่างกับคลอลาเจนที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนมากเป็นคลอลาเจน Type I (Yoshinska and Mizuta, 1999) มีการศึกษาคลอลาเจนในกล้ามเนื้อส่วน mantle ของ common squid (*Todarodes pacificus*) พบว่าเป็นคลอลาเจนชนิดที่มีความจำเพาะชนิด Pepsin-solubilized ซึ่งเป็นคลอลาเจน ที่มีชื่อเรียกเฉพาะว่า Type SQ-I ไม่ละลายใน 0.5 M acetic acid หรือ 0.45 M NaCl ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับกรดอะมิโนที่มีอยู่ในคลอลาเจน Type I ในสัตว์มีกระดูกสันหลังคลอลาเจน Type SQ-I เป็นคลอลาเจนที่สำคัญเป็นส่วนประกอบหลักของกระดองและลำตัวของ Common squid (*Todarodes pacificus*) และยังพบได้ในส่วนลำตัวและหนวดของ Octopus (*Octopus vulgaris*) แล้วยังมีลักษณะคล้ายกับคลอลาเจนที่มาจาก sucker ของ Cuttlefish และ Octopus (Yoshinaka and Mizuta, 1999)

Nagai *et al.* (2000) ได้ศึกษาคุณสมบัติและลักษณะของคลอลาเจนจาก Jellyfish (*Rhopilema asamushi*) พบปริมาณคลอลาเจนปริมาณ 35.2% ของน้ำหนักแห้ง และมีคุณสมบัติคล้ายกับ pepsin-solubilized collagen จากปลาหมึกที่มีรูปร่างแบบทรงกระบอก เช่น หมึกกระดอง หมึกหอม เป็นต้น แต่ก็ยังมีความแตกต่างของปริมาณกรดอะมิโนกับคลอลาเจนจากปลาหมึกที่มีรูปร่างแบบทรงกลม เช่น หมึกยักษ์ โดยคลอลาเจนในกลุ่มนี้มีขนาดใหญ่ประกอบด้วย 4 subunit

คลอลาเจนในปลา (Collagen in fish)

Hassan and Mathew (1996) กล่าวว่ามีปลามากกว่า 20 ชนิดที่เป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญและมากกว่า 30 ชนิดเป็นปลาที่ติดมากับการทำการประมงและเป็นปลาที่ไม่มีมูลค่าสูงมากนักหรือที่เรียกกันว่าปลาเป็ด โดยปลาแต่ละชนิดก็มีระดับโปรตีนที่แตกต่างกันเมื่อแยกตามร้อยละของคลอลาเจนที่เป็นส่วนประกอบสามารถแยกได้ 3 ประเภท

1. ปลาที่มีระดับคลอลาเจนน้อยกว่า 5% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด จัดเป็นกลุ่ม Low collagen fishes
2. ปลาที่มีระดับคลอลาเจนระหว่าง 5% - 10% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด จัดเป็นกลุ่ม Medium collagen fishes

3. ปลาที่มีคลอลาเจนสูงกว่า 10% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด จัดเป็นกลุ่ม High collagen fishes

โดยจะพบคลอลาเจนมากถึง 13.39% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยคลอลาเจนทั้งที่ละลายได้และละลายไม่ได้

ตาราง 4 ปริมาณคลอลาเจนที่พบในกล้ามเนื้อของปลาชนิดต่างๆ

Common name	Acid soluble collagen (% of wet tissue)	Insoluble collagen (% of wet tissue)	Total collagen (% of wet tissue)	Total collagen (% of total protein)
White pomfret	0.19	0.11	0.30	1.58
Sardine	0.36	0.09	0.45	2.2
Mackerel	0.38	0.09	0.47	2.41
Sole	0.40	0.18	0.58	2.98
Vatta	0.50	0.08	0.58	2.89
Ribbon fish	0.12	0.51	063	2.87
White bait	0.09	0.60	0.69	3.28
Tilapia	0.47	0.22	0.69	3.85
Common carp	0.49	0.21	0.70	3.25
Rohu	0.28	0.46	0.74	3.92
Palankanni	0.38	0.41	0.79	4.36
Paral	0.66	0.31	0.97	5.36
Veloori	0.66	0.62	1.28	7.06
Kilimeen	0.09	1.01	1.10	5.69
Mullet	0.94	0.25	1.19	5.89
Catla	0.71	0.55	1.26	6.63
Tuna	1.06	0.39	1.45	7.35
Whiting	1.00	1.08	2.14	9.08
Ray	2.30	0.50	2.80	13.39
Shark	2.13	0.86	2.99	13.11

ที่มา : Hassana and Mathew (1996)

การแบ่งประเภทของคลอลาเจนสามารถแบ่งได้เป็นคลอลาเจนที่สามารถละลายได้ในกรดและคลอลาเจนส่วนที่เป็นโปรตีนของเนื้อเยื่อ (กล้ามเนื้อที่เป็นสีขาว, กล้ามเนื้อแดง, อวัยวะภายในช่องท้อง, หนัง, เกล็ด, กระดูกและครีบ เป็นต้น) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของปลา ตัวอย่างเช่น ปลา Japanese eel (*Anguilla japonica*) มีปริมาณคลอลาเจน 6.97% ของน้ำหนักตัวและมีคลอลาเจนที่เป็นชนิดละลายได้ในกรดอยู่ประมาณ 13.1% ของปริมาณคลอลาเจนทั้งหมด แต่โดยเฉลี่ยปริมาณคลอลาเจนจะมีมากในส่วนของหนัง เกล็ด กระดูก และครีบ ในกล้ามเนื้อจะพบปริมาณของคลอลาเจนในปลาที่มีกล้ามเนื้อมีขาว (เช่น ปลาเผาะ ปลาฉลาม ปลากระเบน) มากกว่าปลาที่มีกล้ามเนื้อสีแดง (เช่น ปลาซาดีน ปลาแมคาแรล) และส่วนของอวัยวะภายในจะพบปริมาณคลอลาเจนน้อยที่สุดเมื่อเทียบต่อน้ำหนัก (Yoshinaka *et al.*, 1990) และจากการศึกษาของ Saito *et al.* (1997) ได้สกัดคลอลาเจนออกจากกล้ามเนื้อของปลาสามารถทำได้โดยการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คลอลาเจนทิ้งโดยใช้สารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยได้ทำการทดลองสกัดคลอลาเจนจากกล้ามเนื้อปลาไนโดยใช้สารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 N ในการกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการทิ้ง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าสารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 N สามารถจำกัดโปรตีนที่ไม่ต้องการได้บางส่วนและพบว่าสารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 N มีผลในการทำลายโครงสร้างของคลอลาเจนทำให้คลอลาเจนเสียสภาพเมื่อสิ้นสุดการทดลอง Mizuta *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาวิธีสกัดคลอลาเจนจากกล้ามเนื้อของ Skate (*Raja kenojei*) โดยใช้เอนไซม์ Pepsin เป็นตัวทำละลายร่วมกับ Ammonium sulfate ในความเข้มข้นต่างๆ กัน สามารถสกัดคลอลาเจนได้ชนิด Type I และ Type II ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nagai *et al.* (2002a) ที่กล่าวว่าสามารถสกัดคลอลาเจนจากหนังของ Eclat puffer fish (*Takifuhu rubripes*) โดยใช้ ASC (Acid- solubilized collagen) และ PSC (Pepsin-solubilized collagen) โดย ASC สามารถสกัดคลอลาเจนได้ประมาณ 10.7% ของน้ำหนักแห้งซึ่งน้อยกว่า PSC ที่สามารถสกัดคลอลาเจนได้ประมาณ 44.7% ของน้ำหนักแห้ง Nagai and Suzuki (2000a) ได้ศึกษาวิธีการแยกคลอลาเจน Type I จากหนัง กระดูกและครีบ ของปลาหลายๆ ชนิด พบว่าให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปลาแต่ละชนิดให้คลอลาเจนที่มีคุณสมบัติที่แตกต่าง และยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือการเสื่อมสภาพของคลอลาเจนที่สกัดได้รวมทั้งได้รายงานว่าคลอลาเจนที่สกัดได้จากอวัยวะที่ต่างกันมีระดับการเสื่อมสภาพในอุณหภูมิที่ต่างกันด้วย

คุณสมบัติของคลอลาเจน

งานวิจัยจำนวนมากมีเป้าหมายเพื่อการหาความแตกต่างทางคุณสมบัติของคลอลาเจนจากปลา คุณลักษณะต่าง ๆ ของคลอลาเจนที่มีการศึกษากัน คือ คุณสมบัติด้านความร้อน ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ องค์ประกอบหน่วยย่อย ความเหนียว ปริมาณของคลอลาเจน ความสามารถในการละลาย และแผนที่เพปไทด์ เป็นต้น

1. คุณสมบัติด้านความร้อน (Thermal property)

ความเสถียรของคลอลาเจนโดยมากขึ้นอยู่กับพันธะไฮโดรเจนระหว่างห่วงโซ่ที่เกี่ยวพันกับ Glycine ณ ตำแหน่งทุก ๆ 3 หน่วยย่อยที่หมุนเวียนอย่างจำเพาะเกี่ยวกับพันธะตามยาวของโพลีเพปไทด์แกนหลัก เนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโนที่ค่อนข้างสูง การสูญเสียสภาพธรรมชาติของคลอลาเจนเกิดช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนชนิดอื่น อุณหภูมิการสูญเสียสภาพธรรมชาติจะทำให้เกิดการคลายเกลียวออกครึ่งหนึ่งอย่างสุ่มของสายโซ่ (Gelatinization) ในช่วงอุณหภูมิแคบ ๆ และขึ้นอยู่กับต้นกำเนิดของคลอลาเจน ซึ่งมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน คือ การแตกโครงสร้างเกลียว โดยการทำลายพันธะไฮโดรเจนสะพานน้ำระหว่างเกลียวของโมเลกุลและติดตามด้วยการเชื่อมต่อพันธะไฮโดรเจนระหว่างเกลียวภายในของสายโซ่โพลีเพปไทด์ สายใยที่ไม่สามารถละลายได้เสียสภาพ ณ อุณหภูมิที่ทำให้หดลง ซึ่งจะมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิการเสียสภาพของโทรโปคลอลาเจนเพียงเล็กน้อย (Swan and Toray, 1991) ความเสถียรของคลอลาเจนและระดับการเกี่ยวพันนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณกรดอะมิโน (proline and hydroxyproline) ที่ขึ้นกับอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมและอุณหภูมิของร่างกาย โดยมากมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิร่างกาย 2-3 องศา โดยทั่วไปปริมาณกรดอะมิโนในคลอลาเจนปลาจะมีค่าต่ำทำให้มีค่าอุณหภูมิการเสียสภาพต่ำกว่าคลอลาเจนของสัตว์บกอื่น ๆ (Saito *et al.*, 2001)

Nagai *et al.* (2000) รายงานว่าอุณหภูมิการเสียสภาพของคลอลาเจน (T_d) สามารถหาได้จาก Thermal denaturation curve ที่ได้จากการวัดความเหนียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน โดยใช้สารละลายคลอลาเจน 0.03% ในกรดอะซิติก 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเหนียวลงครึ่งหนึ่งอย่างสมบูรณ์ คืออุณหภูมิการเสียสภาพของคลอลาเจน (T_d) โดยการให้ความร้อนกับคลอลาเจนจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ คือการแยกตัวของโครงสร้าง Triple helices ของคลอลาเจนแบบสุ่มอันเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของคลอลาเจน ความเหนียว การตกตะกอน การแพร่ การกระเจิงของแสงและพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับแสงต่าง ๆ (Usha and Ramasami, 2004) จากการศึกษาการแยกคลอลาเจนจากเศษเหลือหนังปลาพบว่าอุณหภูมิการเสียสภาพของคลอลาเจนจากหนังปลา Japanese sea bass

มีค่าเท่ากับ 26.5 องศาเซลเซียส ปลา Chub mackerel เท่ากับ 25.6 องศาเซลเซียส และปลา Bullhead shark เท่ากับ 25.0 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าน้อยกว่าอุณหภูมิการเสียสภาพของคลอลาเจนจากหนังหมู ที่มีค่าเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ทราบว่าความเสถียรของคลอลาเจนได้รับอิทธิพลจากอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมและอุณหภูมิร่างกายของสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าคลอลาเจนที่สกัดได้จาก หนัง ครีบและกระดูกของปลา Japanese sea bass มีค่าอุณหภูมิของการเสียสภาพที่ต่างกัน คือ 26.5, 28.0 และ 30.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

นอกจากนี้ Nishimoto *et al.* (2007) รายงานว่า Maximum thermal transition (T_{max}) ของคลอลาเจนที่สกัดได้โดยใช้กรดอะซิติก 0.05 โมลาร์ มีค่าเท่ากับ 32.5 องศาเซลเซียส ซึ่งมากกว่าค่าของคลอลาเจนที่สกัดได้โดยใช้เปปซินเล็กน้อยคือประมาณ 1 องศาเซลเซียส การที่อุณหภูมิของการสูญเสียสภาพของคลอลาเจนที่สกัดด้วยเปปซินมีค่าต่ำกว่าอาจเนื่องมาจากคอลลาเจนที่สกัดโดยใช้เอนไซม์เปปซินมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าเนื่องจากผ่านการย่อยสลายโดยเปปซินโดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างบริเวณเทโลเพปไทด์ อย่างไรก็ตามค่าอุณหภูมิของการเสียสภาพของคลอลาเจนที่ต่ำอาจเนื่องมาจากระดับ Proline hydroxylation ของคลอลาเจนของปลาชนิดนั้นมีค่าค่อนข้างต่ำนั่นเอง (Hyaychi and Nagai, 1979) ปริมาณกรดอะมิโนที่ค่อนข้างสูงมีผลให้คลอลาเจนมีเสถียรภาพ (Xu *et al.*, 2002) และเสถียรภาพด้านความร้อน (Thermal stability) ของ collagen triple helix ถูกอธิบายโดยโครงข่ายพันธะไฮโดรเจนทีมีโมเลกุลของน้ำเป็นสื่อกลาง ซึ่งเชื่อมต่อหมู่ไฮดร๊อกซิลของไฮดร๊อกซิโปรลีนในหนึ่งเกรียวกับหมู่คาร์บล๊อกซิลของสายโซ่หลักของสายโซ่อื่น (Babu *et al.*, 2001) ดังนั้นความแตกต่างในปริมาณของไฮดร๊อกซิโปรลีนอาจช่วยหาระดับอุณหภูมิของการสูญเสียสภาพของคลอลาเจนในปลาชนิดต่าง ๆ ได้

ขณะที่ Sadowska *et al.* (2003) รายงานว่าจากการศึกษา Thermal denaturation curve ของคลอลาเจนที่สกัดได้จากปลา Toadfish หลังสีน้ำตาล พบว่ามีค่าอุณหภูมิของการสูญเสียสภาพมีค่าเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าอุณหภูมิของการเสียสภาพของคลอลาเจนที่ได้จากหนังหมูอยู่ 9 องศาเซลเซียส โดยได้อธิบายเหตุผลว่าอุณหภูมิของการสูญเสียสภาพของคลอลาเจนนั้นมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของร่างกายสัตว์และอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมที่สัตว์นั้นอาศัยอยู่ ซึ่งปลา Toadfish หลังสีน้ำตาลนี้อาศัยอยู่ในน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ค่าอุณหภูมิของการสูญเสียสภาพของคลอลาเจนของสัตว์ยังขึ้นอยู่กับปริมาณกรดอะมิโน อันได้แก่ Proline Hydroxyproline ถ้ามีปริมาณกรดอะมิโนสูงโครงสร้างเกรียวของโมเลกุลคลอลาเจนจะมีความเสถียรสูง ซึ่งในปลาน้ำเย็นจะมีปริมาณกรดอะมิโนค่อนข้างต่ำ ซึ่งเหตุผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกันกับรายงานของนักวิจัยอีกหลายท่าน

Maria and Ilona (2005) รายงานว่าระดับอุณหภูมิของการสูญเสียสภาพของคลอลาเจนจากปลามีผลต่อการตกตะกอนคลอลาเจนออกจากสารละลาย เช่น การศึกษาการตกตะกอนคลอลาเจนจากหนังปลา Cod ออกจากสารละลายโดยใช้สารละลาย K-carrageenan ซึ่งเป็นคลอลาเจนที่มีค่าอุณหภูมิของการสูญเสียสภาพเท่ากับ 15 องศาเซลเซียส ในการตกตะกอนคลอลาเจนดังกล่าวออกจากสารละลาย ณ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการรบกวนพันธะไฮโดรเจนและปฏิกิริยาไฮโดรโฟบิก เป็นผลให้เกิดการทำลายโครงสร้างอันเหนียวแน่นแบบ Triple helix ของคลอลาเจน กลายเป็นโครงสร้างที่มีขนาดเล็กลง ได้แก่ สายโซ่ Single poly peptide (องค์ประกอบแอลฟา) Dimer (องค์ประกอบเบต้า) และTrimer (องค์ประกอบแกมมา) ที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่าโครงสร้างดั้งเดิม ซึ่งเป็นเหตุให้ปริมาณคลอลาเจนที่สามารถตกตะกอนได้ ณ อุณหภูมิดังกล่าวมีค่าน้อยกว่าการตกตะกอนคลอลาเจน ณ อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับคำอธิบายของ Ledward (2000) ที่ระบุว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลใหญ่สามารถตกตะกอนใน Anionic polysaccharides ได้ดีกว่า

2. ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (Amino acid composition)

โมเลกุลของคลอลาเจนต่างชนิดกันของปลามีความแตกต่างกันค่อนข้างมากในชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในระดับของปริมาณของกรดอะมิโนในปลาต่างชนิดกัน โดยปริมาณกรดอะมิโนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Hydroxyproline นั้นขึ้นกับอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่อันมีผลต่อความเสถียรต่อความร้อนของคลอลาเจนด้วย คลอลาเจนที่ได้จากปลาที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำจะมีปริมาณ Hydroxyproline ต่ำกว่าปลาที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิที่สูงกว่า นอกจากนี้ Zhang *et al.* (2007) ได้รายงานว่าปริมาณกรดอะมิโนในคลอลาเจนจากหนังปลาคาร์ฟ มีค่าเท่ากับ 186/1000 หน่วย ซึ่งมีค่าน้อยกว่าปริมาณกรดอะมิโนของคลอลาเจนจากหนังหมูและหนังวัวที่มีค่าเท่ากับ 220/1000 และ 215/1000 ตามลำดับ สอดคล้องกับการรายงานของนักวิจัยอีกหลายท่านที่ระบุว่าปริมาณกรดอะมิโนในคลอลาเจนจากปลามักจะมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดอะมิโนในคลอลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเสมอ แต่กรดอะมิโนชนิดเด่นที่พบในคลอลาเจนจากทั้ง 3 แหล่งมีสัดส่วนคล้ายกันคือมี Glycine ประมาณ 1/3 และมีปริมาณ Methionine tyrosine และ Histidine น้อยมาก อย่างไรก็ตาม Muyonga *et al.* (2004) รายงานว่าชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลา Nile perch วัยอ่อนและแก่ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าอายุของสัตว์ทดลองไม่มีผลต่อชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจน

ขณะที่ Nishimoto *et al.* (2005) รายงานว่าการศึกษาชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนจากกล้ามเนื้อปลา Japanese amberjack (*Seriola quinqueradiata)* ชนิดปกติและกล้ามเนื้อสีดำ พบว่า องค์ประกอบของกรดอะมิโนในคลอลาเจนจากกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชนิดมีความคล้ายกันมาก คือ มีกรดอะมิโนชนิด Glycine ประมาณ 1/3 รองลงมา คือ Alanine และ Proline ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดอะมิโนชนิดอื่นมีค่อนข้างน้อย แต่มีความแตกต่างกันในปริมาณกรดอะมิโนชนิดไฮดร็อกซิโปรลีนคือกล้ามเนื้อสีดำมีปริมาณมากกว่าเล็กน้อย ผลดังกล่าวใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Takeshi and Nobutuka (2000) ที่ศึกษาคุณสมบัติของคลอลาเจนจากเกล็ดปลาทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Sardine Red sea bream และ Japanese sea bass ที่มีชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ คือ Glycine เท่ากับ 340/1000 340/1000 และ 341/1000 ตามลำดับ รองลงมา คือ Alanine Proline และ Hydroxyproline ตามลำดับ และในปี 2002 เขายังได้รายงานว่าชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนจากหนังปลา Ocellate puffer fish นั้นมีปริมาณ Glycine สูงสุดกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณ Alanine Proline และ Glutamic ในปริมาณที่ลดหลั่นกันลงมา Ogawa *et al.* (2003) รายงานว่าชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนจากกระดูกและเกล็ดของ Black drum และ Sheephaed seabream มีรูปแบบที่คล้ายกัน คือมีปริมาณ Proline glycine และ Alanine สูง นอกจากนี้จากการศึกษาชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบนี้เองที่ทำให้ทราบว่าองค์ประกอบทางเคมีของคลอลาเจน Type I มีสภาพอนุรักษ์สูงระหว่างชนิดของเนื้อเยื่อ Matsui *et al.*, (1991) รายงานว่ากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนที่สกัดจากหนังหมูและกระดูกปลาที่เป็นเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมี Glycine เป็นองค์ประกอบ 33% และ 27% และมีปริมาณ Hydroxyproline และProline เป็นองค์ประกอบ 7.6 - 7.9% และ 11.4 – 12.6% ตามลำดับ

Nishimoto *et al.* (2005) รายงานว่าในการจำแนกชนิดและคุณสมบัติของชนิดของโมเลกุลของคลอลาเจนในกล้ามเนื้อปรกติและหนังของปลา Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* พบว่าชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจน Type I มีปริมาณกรดอะมิโน Alanine มากกว่า และ Hydroxyproline ต่ำกว่า คลอลาเจน Type V นอกจากนี้ยังพบว่าคอลลาเจน Type V จากเนื้อเยื่อต่างชนิดกันมีความแตกต่างในชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ คือ คลอลาเจน Type V จากกล้ามเนื้อปรกติมีปริมาณกรดอะมิโน Arginine Alanine Proline และ Lysine มากกว่า และมีปริมาณกรดอะมิโน Glutamine และ Leusine น้อยกว่าคอลลาเจน Type V จากหนัง

3. องค์ประกอบของหน่วยย่อย

รูปแบบขององค์ประกอบหน่วยย่อยของคอลลาเจนสามารถศึกษาได้โดยใช้ Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) Nalinanon *et al.* (2007) รายงานว่ารูปแบบ electrophoresis ของคลอลาเจนที่สกัดได้ภายใต้สภาวะ Reducing พบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลา Bigeye snapper ด้วยเอนไซม์เปปซินของปลา Bigeye snapper และเอนไซม์เปปซินของหมูที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มีองค์ประกอบที่คล้ายกัน คือ สายโซ่เบต้ามีปริมาณค่อนข้างมากและเด่น และพบว่ามีแอลฟ่า 1 และ 2 เป็นองค์ประกอบของสายโซ่แอลฟ่าด้วย ซึ่งจากรูปแบบดังกล่าวทำให้ทราบว่าคลอลาเจนที่สกัดได้เป็นชนิด Type I ซึ่งเป็นชนิดเด่นที่พบในหนังปลา นอกจากนี้ยังพบว่าการสกัดด้วยกรดและเอนไซม์เปปซินให้ผลที่แตกต่างกันเล็กน้อยในมวลโมเลกุลขององค์ประกอบแอลฟ่า 1 และแอลฟ่า 2 โดยการสกัดด้วยเอนไซม์เปปซินทำให้เกิดการตัดโมเลกุลบริเวณ Telopeptide ของคลอลาเจนออกเล็กน้อยจึงเป็นผลให้คลอลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์เปปซินมีมวลโมเลกุลขององค์ประกอบแอลฟ่า 1 และแอลฟ่า 2 ต่ำกว่าคลอลาเจนที่ได้จากการสกัดด้วยกรด ส่วน Senaratne *et al.* (2005) ได้ศึกษาถึงองค์ประกอบหน่วยย่อยของปลา Brown backed toadfish skin พบว่าคลอลาเจนดังกล่าวมีหน่วยย่อยแบบ Heterotrimer ที่ประกอบด้วยสายโซ่แอลฟ่า 1 2 และ 3 อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าหนังปลามีกระดูกที่มีสายโซ่แอลฟ่า 3 เป็นหน่วยย่อย คือ ปลาไหล ปลาซาดีน ปลาแซลมอน ปลาเรนโบว์เทราท์ ปลาคาร์ฟ ปลาแมคเคอเรล ปลานิล และปลาราคูด้า เป็นต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของคลอลาเจน (The factors affecting collagen properties)

มีปัจจัยหลากหลายที่ทำให้คุณสมบัติของคลอลาเจนมีความแตกต่างกัน ได้แก่

1. อายุ

สัตว์ที่มีอายุที่ต่างกันจะมีความแตกต่างของเนื้อเยื่อต่างๆ โดยในสัตว์ที่มีอายุน้อยจะมีการพัฒนาของอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ในระดับที่ไม่มีความสมบูรณ์และไม่มีความแข็งแรงของโครงสร้าง ซึ่งต่างจากสัตว์ที่มีอายุมากกว่าโดยเฉพาะสัตว์ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์จะมีเนื้อเยื่อและโครงสร้างของร่างกายที่สมบูรณ์และมีความแข็งแรงอย่างเต็มที่ ไม่รวมทั้งสัตว์ที่มีอายุมากเกินวัยเจริญพันธุ์เนื่องจากร่างกายเริ่มมีการเสื่อมสภาพทำให้เนื้อเยื่อและโครงสร้างไม่แข็งแรง ทำให้คลอลาเจนที่พบในสัตว์แต่ละช่วงอายุจะมีความแตกต่างกันทั้งความคงตัว ความยืดหยุ่น และความสามารถในการเพิ่มจำนวนเพื่อทดแทนส่วนที่เสื่อมสภาพไป (Nomura *et al.*, 1996) ซึ่งแตกต่างกับเนื้อเยื่อของปลาที่มีการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนเนื้อเยื่อที่เสื่อมสภาพไปตลอดช่วงอายุและส่วนใหญ่

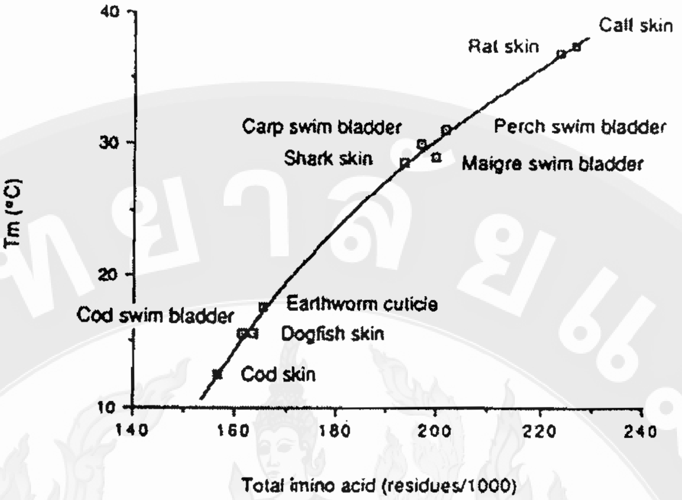
เป็นเนื้อเยื่อที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวและเป็นโครงสร้างของร่างกาย (เกล็ด ครีบและก้านครีบ) ที่มีโครงสร้างที่มีเส้นใยของคลอลาเจนอยู่ในปริมาณที่สูง (Foegeding *et al.*, 1996) คลอลาเจนจากสัตว์ที่อายุน้อยมีความสามารถในการละลายสูงแต่ก็มีโครงสร้างที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงทำให้คุณสมบัติในการคงตัวมีน้อยกว่าคลอลาเจนจากสัตว์ที่มีอายุมากกว่า ดังนั้นอายุสามารถที่จะบ่งบอกถึงคุณสมบัติของคลอลาเจนที่พบในสัตว์ชนิดนั้นๆ ได้

2. การขาดสารอาหาร

ปลาบางชนิดที่มีวงจรชีวิตแบบอพยพย้ายถิ่นทำให้ในบางช่วงไม่ได้รับอาหารหรือได้รับอาหารในปริมาณที่ไม่เพียงพอพบว่าปริมาณของคลอลาเจนในร่างกายลดลง และเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่นๆ ปลาจะมีปริมาณคลอลาเจนในร่างกายเพิ่มขึ้นตามอายุและตามขนาดของลำตัว (Ogawa *et al.*, 2003) จากการศึกษาของ Foegeding *et al.* (1996) พบว่าปลาที่ได้รับอาหารในระดับต่างกันให้ปริมาณคลอลาเจนที่ไม่เท่ากันและมีคุณสมบัติบางประการที่ต่างกัน โดยในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่พอเพียงให้ปริมาณคลอลาเจนที่มากกว่าปลาที่ได้รับอาหารน้อย และยังเป็นคลอลาเจนที่มีคุณสมบัติที่มีความคงตัวสูง

3. ปริมาณ Amino acid

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ Amino acid (Proline และ hydroxyproline) ดังนั้นถ้ามีปริมาณของ Amino acid มากจะทำให้ความคงตัวของคลอลาเจนมีเพิ่มขึ้น (Wong, 1989) โดยคลอลาเจนที่ปริมาณของ Amino acid สูงจะพบได้ในปลาที่อยู่ในเขตร้อน และในทางตรงกันข้ามในปลาเขตหนาวจะพบปริมาณของ Amino acid ที่ต่ำลง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิของน้ำ แหล่งที่อยู่อาศัย โดยทั้งหมดก็เกี่ยวเนื่องกับอุณหภูมิ (Foegeding *et al.*, 1996)



ภาพ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดอะมิโน (Proline+hydroxyproline) และปริมาณการละลายตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิคลอลาเจนจากสัตว์ที่ต่างชนิดกัน (Foegeding *et al.*, 1996)

4. pH และปริมาณเกลือ

Montero *et al.* (1999 อ้างโดย Noitup (2004) กล่าวว่าโดยปรกติแล้วโปรตีนสามารถละลายได้ในกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.5 M จึงได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดคลอลาเจนจากหนังและกล้ามเนื้อของปลา Hake (*Merluccius merluccius*) โดยทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วย กรดอะซิติกที่มีระดับของ Ionic และ pH ที่ต่างกัน พบว่าสามารถสกัดคลอลาเจนจากหนังได้มากกว่าคลอลาเจนจากกล้ามเนื้อ โดยที่คุณสมบัติของคลอลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกที่ pH 2 pH 4 โดยใช้ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 M มีความคงตัวได้ดีที่สุดเมื่อสิ้นสุดขบวนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ และ พบว่าความสามารถในการละลายของคลอลาเจนที่สกัดจากหนังของปลา Hake และปลา Trout โดยใช้กรดอะซิติกที่มีระดับของ Ionic และ pH ที่ต่างกันลดน้อยลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลอลาเจน ดังนั้นความสามารถในการละลายของคลอลาเจนจะลดลงเมื่อมีปริมาณความเข้มข้นของ Ionic และค่า pH เพิ่มสูงขึ้น 1 – 3 และยังพบว่าคลอลาเจนจากปลา Hake มีความสามารถในการละลายได้สูงกว่าคลอลาเจนจากปลา trout

5. กระบวนการในการสกัด

Montero *et al.* (1999 อ้างโดย Kittipatanabowon *et al.* 2005) ได้เปรียบเทียบคุณสมบัติคลอลาเจน 4 วิธีการ ดังนี้

- แช่แข็ง (Freezing)
- ทำให้แห้งโดยใช้ความเย็น (Freeze – drying)
- ละลายด้วย 0.05 M acetic acid แล้วแช่เย็น
- ละลายด้วย 0.05 M acetic acid แล้วทำให้แห้งโดยใช้ความเย็น

จากผลการทดลองพบว่าวิธีการทำให้แห้งโดยใช้ความเย็นทำให้ความสามารถในการละลายลดลงและยังทำให้ความหนืดเพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่แช่แข็งพบว่าความสามารถในการละลายไม่มีการเปลี่ยนแปลง แล้วยังสามารถละลายได้ดีในน้ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัตถุดิบ

เศษปลาจีน (Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*) จากกระบวนการแปรรูปสินค้าพื้นเมือง (ปลาส้ม) โดยระหว่างการขนส่งจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจะนำมาคัดเลือกเอาส่วนเกล็ด กระดูกและครีบ แล้วล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเพื่อกำจัดเศษเนื้อ ไขมัน และเลือดที่ติดมาแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นครั้งสุดท้าย นำส่วนของกระดูกและครีบมาตัดให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร แยกเก็บแต่ละส่วนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัดคลอลาเจน

2. สารเคมี

1. Tris (Amresoco, Biotechnogy Grade)
2. Tris HCL (Amresoco, Biotechnogy Grade)
3. Glycine (Vibantis, USA)
4. Sodium dodecyl sulfate (Fisher Chemicals)
5. Hydrochloric acid (MERCK)
6. Acetic acid (MERCK)
7. Sulfuric acid (MERCK)
8. Sodium hydroxide (MERCK)
9. Ammonium persulfate (BHD, England)
10. 2 – mercapthoethanol (BHD, England)
11. Glycerol (MERCK)
12. Bromophenol blue (BHD, England)
13. Sucrose (BHD, England)
14. Bis – Acrylamide (Amresoco, Biotechnogy Grade)
15. Acrylamide (Amresoco, Biotechnogy Grade)
16. Butanol (Fluka, chemika)

17. TEMED (Amresoco, Biotechnogy Grade)
18. Methanol (Fluka, chemika)
19. Ethanol (Fluka, chemika)
20. Acetic Acid (Fluka, chemika)
21. Potassium sulfate (Fluka, chemika)
22. Copper sulfate (Fluka, chemika)
23. Methyl red (Fluka, chemika)
24. Methylene blue (Fluka, chemika)
25. Easy-fast amino acid sample test kit : GC-MS (Phenomenex : USA)
26. Protein silver stain Kit (Dry polyacrylamide gel)

3. อุปกรณ์

1. เครื่องบดเนื้อ
2. Hotplate Stirrer
3. Power supply unit
4. Electrophoresis tank
5. Electrodes
6. Gel casting unit
7. Frame gel dry
8. pH meter
9. Hot air oven
10. เครื่องกลั่นวิเคราะห์โปรตีน
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (4 องศาเซลเซียส)
12. Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector
13. 7683 Series injector
14. 6890 N Network GC System
15. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่จำเป็นในห้องปฏิบัติการ

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การสกัดคลอลาเจน

4.1.1 การสกัดคลอลาเจนจากเกล็ด

นำเกล็ดปลามาล้างด้วยน้ำเย็นเพื่อกำจัดเมือกและเศษเนื้อเยื่อต่างๆ ให้สะอาด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นเป็นครั้งสุดท้าย จากนั้นนำไปแผ่บนตะแกรงนำไปแช่ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เกล็ดแห้ง วิธีการสกัดคลอลาเจนโดยนำเกล็ดปลาที่ผ่านการทำความสะอาดผสมกับ NaOH ความเข้มข้น 0.1 N (1:10 w/v) ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer นาน 6 ชั่วโมง ให้เปลี่ยนสารละลายทุก 2 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาให้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นจนสะอาด จากนั้นนำเกล็ดไปผสมกับ Butyl alcohol (1:10, w/v) ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer นาน 18 ชั่วโมง ให้เปลี่ยนสารละลายทุก 6 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาให้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นจนสะอาดแล้วนำไปผสมกับ Acetic acid 0.5 M) ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer นาน 48 ชั่วโมง จนเกิดตะกอน (หากไม่พบตะกอนให้ปั่นซ้ำ) จากนั้นกรองเกล็ดออกนำสารละลายไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm นาน 60 นาที เก็บตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นให้สะอาดเตรียมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน

4.1.2 การสกัดคลอลาเจนจากหนัง

นำหนังปลามาล้างด้วยน้ำเย็นเพื่อกำจัดเมือกและเศษเนื้อเยื่อต่างๆ ให้สะอาด ตัดแบ่งเป็นชิ้นขนาด 1x1 เซนติเมตร แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นเป็นครั้งสุดท้าย จากนั้นนำไปแผ่บนตะแกรงนำไปแช่ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) วิธีการสกัดคลอลาเจนโดยนำหนังปลาที่ผ่านการทำความสะอาดผสมกับ NaOH ความเข้มข้น 0.1 N (1:10 w/v) ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer นาน 6 ชั่วโมง ให้เปลี่ยนสารละลายทุก 2 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาให้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นจนสะอาด จากนั้นนำไปผสมกับ Butyl alcohol (1:10, w/v) ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer นาน 18 ชั่วโมง ให้เปลี่ยนสารละลายทุก 6 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาให้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นจนสะอาดแล้วนำไปผสมกับ Acetic acid (0.5 M) ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer นาน 24 ชั่วโมง จนเกิดตะกอน (หากไม่มีตะกอนให้ปั่นซ้ำ) จากนั้นกรองเศษหนังออกนำสารละลายไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm นาน 60 นาที เก็บตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นให้สะอาดเตรียมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน

4.1.3 การสกัดคลอลาเจนจากกระดูก

นำกระดูกปลามาล้างด้วยน้ำเย็นเพื่อกำจัดเมือกและเศษเนื้อเยื่อต่างๆ ให้สะอาดแล้วตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นเป็นครั้งสุดท้าย นำไปสกัดคลอลาเจนโดย

นำกระดูกปลาที่ผ่านการทำความสะอาดผสมกับ NaOH ความเข้มข้น 0.1 N (1:10 w/v) ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer นาน 6 ชั่วโมง ให้เปลี่ยนสารละลายทุก 2 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาให้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นจนสะอาด จากนั้นนำกระดูกไปผสมกับ Butyl alcohol (1:10 w/v) ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer นาน 24 ชั่วโมง ให้เปลี่ยนสารละลายทุก 4 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาให้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นจนสะอาดแล้วนำไปผสมกับ Acetic acid 0.5 M) ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer นาน 24 ชั่วโมง จนเกิดตะกอน (หากไม่พบตะกอนให้ปั่นซ้ำ) จากนั้นกรองกระดูกออกนำสารละลายไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm นาน 60 นาที เก็บตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นให้สะอาดเตรียมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ชั่งตัวอย่างคลอลาเจนสกัดบนกระดาษกรองแล้วพับใส่ Kjeldahl flask เติมสารเร่งปฏิกิริยา (Potassium sulfate : Copper sulfate อัตรา 15:1) แล้วเติม H_2SO_4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำพร้อมสารละลายมาตรฐาน) จากนั้นต่อเข้ากับเครื่องทำความร้อนเพื่อให้ตัวอย่างย่อยจนได้สีเขียวใส ทิ้งให้สารละลายเย็นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติม NaOH (เข้มข้น 45%) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วต่อเข้ากับเครื่องกลั่นทันที

เตรียมสารละลาย H_2SO_4 (ความเข้มข้น 0.1 N) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Screened methyl red indicator 4 หยด (Methyl red 0.2 กรัม และ Methylene blue 0.1 กรัม ใน Ethanol 96% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) นำมาต่อเข้าที่ปลายเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อเครื่องกลั่นจุ่มลงในสารละลาย เปิดเครื่องกลั่นให้ทำงานจนปริมาตรสารละลายในขวดรูปชมพู่มีปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำขวดรูปชมพู่ออกนำมาไตเตรทกับสารละลาย NaOH (ความเข้มข้น 0.1 N) จนสารละลายเป็นสีเขียวใส โดยปริมาตรสารละลาย NaOH (ความเข้มข้น 0.1 N) ที่ใช้นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โปรตีนของตัวอย่างคลอลาเจนสกัดจากสูตรต่อไปนี้ (AOAC official method 981.10, 2002)

$$N, \% = (V_A - V_B) \times 1.4007 \times N/g \text{ test portion}$$

$$Protein, \% = (V_A - V_B) \times 1.4007 \times N \times 6.25/g \text{ test portion}$$

โดย V_A = มิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรทสารละลายจากตัวอย่าง

V_B = มิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรทสารละลายจากสารละลายมาตรฐาน

1.4007 = Milliequivalent weight N x 100(%)

N = ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ที่ใช้ไตเตรท

6.25 = ค่าโปรตีนปกติ (ปริมาณไนโตรเจน 16%)

4.3 การ Hydrolysis ตัวอย่างคลอลาเจนสกัด

คำนวณน้ำหนักตัวอย่างคลอลาเจนสกัดจากเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน ดังสมการ

$$W_s = \frac{1000}{N_s}$$

W_s คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N_s คือ เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในตัวอย่าง

เมื่อชั่งตัวอย่างคลอลาเจนสกัดใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิดแล้วเติม HCL ความเข้มข้น 6M ปริมาตร 50 มิลลิลิตร + Phenol solution ปิดฝาให้สนิทจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 – 120 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จนได้สารละลายสีเหลืองใสและไม่มีตะกอน จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หากรดอะมิโน

4.4 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์โดย GC-MS

เตรียมสารละลายตัวอย่างคลอลาเจนสกัดที่ผ่านการ hydrolysis ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปทำให้แห้งด้วยการให้ความเย็น จากนั้นนำตัวอย่างไปเตรียมเพื่อทำ hydrolysates by GC-MS โดยอ้างอิงวิธีการของ AOAC (2002) ด้วยชุดทดสอบของ EZ:faast – Amino Acid Analysis of Protein Hydrolysates by GC-MS

บทที่ 4
ผลการศึกษาและการวิจารณ์

1. ผลการสกัดคลอลาเจน

การสกัดคลอลาเจนจากเศษปลาที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาส้ม กลุ่มผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา โดยทำการคัดเอาเศษปลาส่วนที่เป็นเกล็ด หนัง และกระดูกมาสกัดคลอลาเจนตามวิธีการสกัดที่ดัดแปลงจาก Nagai and Suzuki (2000) และ Noitup (2004) พบว่าปริมาณคลอลาเจนที่ได้จากการสกัดจากเศษปลาเหลือทิ้งทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ ปริมาณคลอลาเจนที่สกัดจากกระดูกปลามีปริมาณมากที่สุดและมีค่าเท่ากับ 340.50 ± 37.77 มิลลิกรัม/100 กรัม ของกระดูกปลา รองลงมาคือปริมาณคลอลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดและหนังปลาที่มีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) คือ มีค่าเท่ากับ 46.39 ± 2.13 มิลลิกรัม/100 กรัม ของเกล็ดปลา และ 42.77 ± 1.40 มิลลิกรัม/100 กรัม ของหนังปลาตามลำดับ และเมื่อนำมาคิดเป็นอัตราร้อยละของปริมาณคลอลาเจนที่สกัดได้ต่อปริมาณวัตถุดิบที่นำมาสกัดพบว่ามีค่าเท่ากับ 3.41 ± 0.38, 0.464 ± 0.021 และ 0.428 ± 0.014 ตามลำดับ

ตาราง 5 ปริมาณและผลผลิตจากการสกัดคลอลาเจนจากเนื้อเยื่อของเศษปลาเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาส้ม 3 ชนิด คือ เกล็ด หนัง และกระดูก

ประเภทเนื้อเยื่อ	ปริมาณคลอลาเจน	
	มิลลิกรัม/100 กรัม ของเนื้อเยื่อ	เปอร์เซ็นต์
เกล็ด	46.39 ± 2.13^{b}	0.464 ± 0.021^{b}
หนัง	42.77 ± 1.40^{b}	0.428 ± 0.014^{b}
กระดูก	340.50 ± 37.77^{a}	3.41 ± 0.38^{a}

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Collagen = Hydroxyproline amino acid x 14.7 (Kimura and Ohno, 1987)

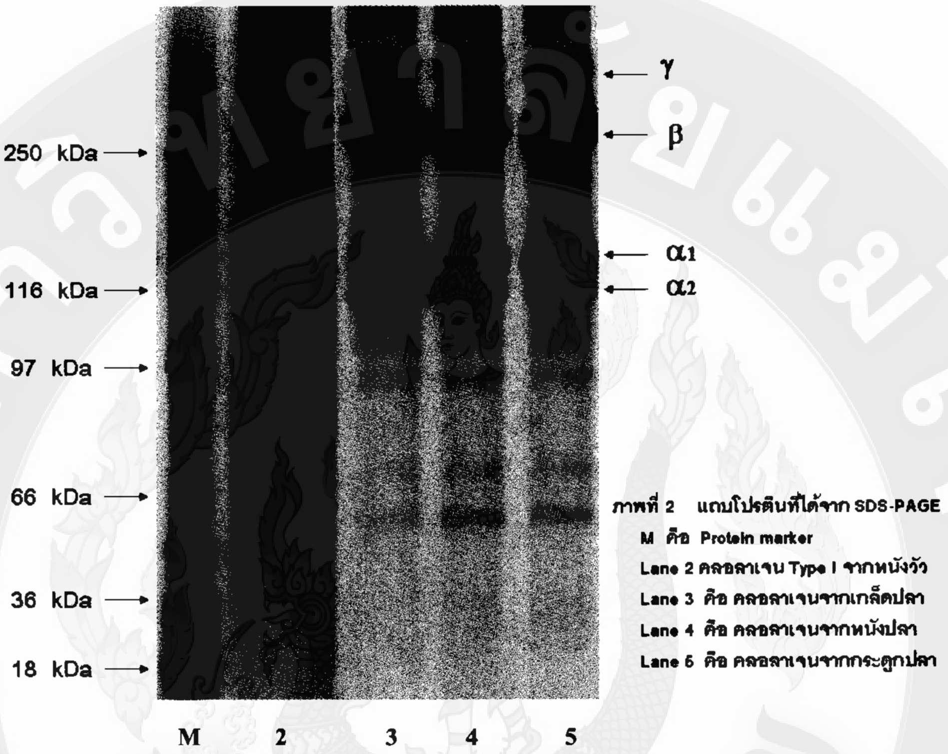
Takeshi (2000) กล่าวว่าปริมาณคลอลาเจนที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ ของปลาทั้งเกล็ด ครีบ หนังหรือกระดูก ซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำย่อมจะมีความแตกต่างของปริมาณคลอลาเจนที่สกัดได้ในแต่ละครั้งเนื่องจากเศษเหลือเหล่านี้ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและการใช้สารเคมี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rodizewicz *et al.* (2008) ที่สกัดคลอลาเจนจากหนังปลา Silver carp จากเศษเหลือจากอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง พบว่าปริมาณคลอลาเจนที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณที่แตกต่างกันและวิธีการสกัดที่แตกต่างก็สามารถทำให้ปริมาณคลอลาเจนต่างกันได้

Zhang *et al.* (2007) อธิบายว่าปริมาณคลอลาเจนที่ละลายในกรดที่สกัดได้โดยใช้วิธีที่ทำการทดลองในการศึกษานี้ที่มีค่าค่อนข้างต่ำอาจเกี่ยวข้องกับ Chain crosslinks บริเวณ Telopeptide มีอยู่ค่อนข้างมาก อันเป็นผลให้คลอลาเจนสามารถละลายในกรดได้ในปริมาณน้อย และจากการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างปริมาณคลอลาเจนที่ละลายในกรดที่มีค่าต่ำกว่าปริมาณคลอลาเจนที่ละลายในเปปซิน ที่สกัดได้จากหนังปลาคาร์ฟเป็นสิ่งหนึ่งที่ช่วยยืนยันสมมติฐานดังกล่าว คือการเติมเปปซินจะมีผลทำให้ Chain Crosslink จำนวนมากบริเวณ Telopeptide ถูกตัดและทำลายทำให้ความแข็งแรงของ Triple Helix ลดลง ทำให้คลอลาเจนดังกล่าวสามารถละลายได้มากขึ้น นอกจากนี้ความแตกต่างของปริมาณคลอลาเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน ส่วนหนึ่งอาจมีผลมาจากโครงสร้างที่ต่างกันของคลอลาเจนของเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิดก็เป็นได้ ดังเช่นการศึกษาของ Zhang *et al.*, (2007) ที่สรุปว่าความแตกต่างของคลอลาเจนจากหนังปลาคาร์ฟและหนังปลานิลขึ้นกับความแตกต่างของระดับ Crosslinks ที่บริเวณ Telopeptide ของคลอลาเจนของปลาทั้ง 2 ชนิด ที่มีความสอดคล้องกับผลได้ของทั้งคลอลาเจนที่ละลายในกรดและคลอลาเจนที่ละลายในเปปซิน อย่างไรก็ตามระบบตัวทำละลายในการสกัดเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อผลได้ของการสกัดคอลลาเจน Nomura *et al.*,(1996) ได้ทำการสกัดคลอลาเจนจากเกล็ดปลา Sardine โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) ที่มี 0.5 M EDTA พบว่า ผลได้จากการสกัดคลอลาเจนประเภทละลายในกรดมีค่าเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ขณะที่ Nagai *et al.*, (2000) รายงานว่าเปบซินทำให้คลอลาเจนละลายได้ง่ายขึ้น และสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ อันเป็นผลให้ผลได้จากการสกัดคลอลาเจนมีค่าสูงและอยู่ในช่วง 38 – 51 เปอร์เซ็นต์ ในปลา Sardine, Red sea bream และ Japanese Sea brass ตามลำดับ

2. SDS-PAGE pattern ของคลอลาเจน

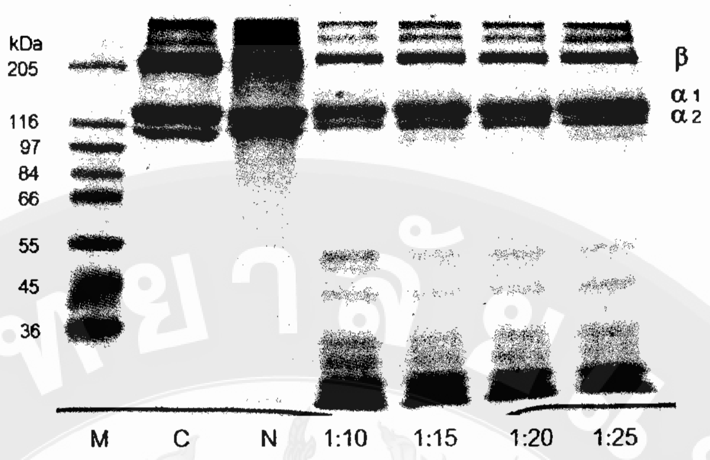
หลังจากได้ทำการศึกษาตัวอย่างคลอลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ด หนังและกระดูก ด้วย SDS-PAGE ที่ใช้ 10% เจล พบว่าคลอลาเจนมีรูปแบบอิเล็คโตรโฟเรซีสคล้ายกับคลอลาเจน Type I จากหนังวัวประกอบด้วยอย่างน้อย 2 α chains คือ α_1 และ α_2 ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 130 และ 120 kDa ตามลำดับ (ภาพ 4) องค์ประกอบทางอิเล็คโตรโฟรีซีสของคลอลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ด หนังและกระดูกของเศษเหลือปลาจากกระบวนการผลิตปลาส้มของเกษตรกร จังหวัดพะเยา มีความแตกต่างจากคลอลาเจน Type I จากหนังวัวเล็กน้อย Rui *et al.* (2008) ศึกษาคลอลาเจนจากหนัง เกล็ดและกระดูกของปลาคาร์ฟ พบว่าความแตกต่างของคุณสมบัติคลอลาเจนแทบจะไม่แตกต่างกันและยังมีความคล้ายกับคลอลาเจน Type I จากหนังวัวโดยพบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบมีความแตกต่างกันเพียง 1% อย่างไรก็ตามยังคงพบว่าคลอลาเจนที่สกัดจากเศษเหลือปลา ได้แก่ เกล็ด หนังและกระดูกและคลอลาเจน Type I จากหนังวัวประกอบด้วย Inter และ Intra molecular cross linked คือ β dimers และ γ trimers ที่พบได้ในการศึกษาโครงสร้างของคลอลาเจนของปลา Bigeye snapper โดย Kittipatanabowon *et al.* (2005) Ocellate pufferfish โดย Nagai *et al.* (2002) Back drum sea bream และ Sheep head sea bream โดย Ogawa *et al.* (2003) รวมทั้ง Nile perch โดย Muyonga *et al.* (2004) อย่างไรก็ตามแถบอิเล็คโตรโฟรีซีสของ α chains ของคลอลาเจนที่สกัดจากเกล็ด หนังและกระดูกของเศษเหลือปลาจากกระบวนการผลิตปลาส้มมีลักษณะค่อนข้างหนากว่าแถบของคลอลาเจน Type I จากหนังวัวเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแถบดังกล่าวยังมี α chains อื่นๆ เป็นองค์ประกอบอีก เช่น α_3 และ α_4 ที่ยังไม่สามารถถูกแยกภายใต้สภาวะอิเล็คโตรโฟรีซีสที่ใช้อยู่นี้ เพราะรูปแบบการเคลื่อนที่ของ α_1 และ α_3 มีความคล้ายกันมากดังที่ปรากฏในรายงานของ Kimura and Ohno (1987) ; Matsui *et al.* (1991) และ Usha and Ramasami (2004) รายงานว่าคลอลาเจนจากเกล็ดและกระดูกของปลา Lathylitic carp ประกอบด้วย 2 รูปแบบโมเลกุล คือ $(\alpha_1)_2\alpha_2$ เป็นชนิดหลัก และ $\alpha_1\alpha_2\alpha_3$ เป็นชนิดรอง และการศึกษาของ S. Rodziewicz *et al.* (2007) ศึกษาวิธีการแยกและลักษณะบางประการของคลอลาเจนจากปลาจีนโดยคลอลาเจนที่สกัดได้เป็นชนิด Type I ประกอบด้วยรูปแบบโมเลกุล 2 รูปแบบคือ α_1 และ α_2 ปริมาณคลอลาเจนที่สกัดได้จากหนังพบมากกว่าจากกระดูกและเกล็ด แต่อย่างไรก็ตามคลอลาเจนชนิดที่ละลายในกรดมักจะมีปริมาณขององค์ประกอบที่เป็น molecular cross linked สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับคลอลาเจนชนิดที่ละลายในเปปซิน (Ogawa *et al.*, 2003) ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนที่เกี่ยวพันทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลของสายโซ่ถูกย่อยสลายได้น้อยกว่า และไม่สมบูรณ์ทำให้หลงเหลือโมเลกุลของคลอลาเจนที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่อยู่ปริมาณมาก โดยเฉพาะแถบอิเล็คโตรโฟรีซีสที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่า 200 kDa ดังแสดงในภาพ 5 Hayachi and Nagai (1979) รายงานว่าการใช้ Globular protein เป็น Molecular

weight marker อาจทำให้การประมาณค่ามวลโมเลกุลของคลอลาเจนผิดพลาด เนื่องจากองค์ประกอบ Alpha chain เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบ Globular protein ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากัน



ภาพ 4 SDS-PAGE pattern ของ Protein marker (M) คลอลาเจน Type I (2) เกล็ด (3) หนัง (4) และกระดูก (5) จากเศษเหลือปลาจากกระบวนการผลิตปลาส้มของเกษตรกรกลุ่มผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

อย่างไรก็ตามคลอลาเจนที่สกัดได้จากหนังมีแถบอิเล็คโตรโฟรีซีสที่ค่อนข้างบางกว่าแถบของคลอลาเจนที่ได้จากเกล็ดและกระดูก ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายโครงสร้างคลอลาเจนในหนังเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าคลอลาเจนจากส่วนอื่นทำให้เกิดแถบที่ไม่ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของนันทพร และคณะ (2550) ศึกษาผลของอุณหภูมิและสัดส่วนของกรดต่อการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดโดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เปปซิน 0.1 % (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสัดส่วนของปริมาณหนังต่อกรดตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:50 แล้วทำการตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.9 โมลาร์ ได้ผลการศึกษา SDS-PAGE ดังแสดงในภาพ 5 ที่พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาสีกูดเป็นชนิด Type I แบบเดียวกับคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังลูกวัว ประกอบด้วยสาย α_1 จำนวน 2 สาย (135 kDa) และ α_2 จำนวน 1 สาย (120 kDa)



ภาพ 5 ผลการศึกษา SDS-PAGE ของคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสีกูด โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เปปซิน 0.1 % (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสัดส่วนของปริมาณหนังต่อกรดตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:50 แล้วทำการตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.9 โมลาร์ (M:standard marker proteins; C:calf skin collagen;N:collagen ectracted at 4°C) โดย นันทพร และคณะ (2550)

3. การศึกษา Amino acid Profiles ของคลอลาเจน

การศึกษาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อปลา ได้แก่ เกล็ด หนัง และกระดูก ซึ่งเป็นเศษเหลือจากการแปรรูป พบว่ากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ได้ผลดังนี้

คลอลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดมีปริมาณ Leucine มากที่สุด คือ 21.87 ± 1.77 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 14.30 ± 1.16 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ Lysine, Phenylalanine, Glycine และ Proline มีปริมาณเท่ากับ 20.57 ± 3.55, 16.78 ± 0.94, 16.36 ± 2.81 และ 15.21 ± 2.81 มิลลิกรัม/100 กรัมคิดเป็น 13.45 ± 2.23, 10.97 ± 0.61, 10.69 ± 1.84 และ 9.94 ± 0.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดอะมิโนมีค่าเท่ากับ 18.37 ± 0.81 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 12.0 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์ คลอลาเจนที่สกัดได้จากหนังมีปริมาณ Glysine มากที่สุด คือ 147.81 ± 2.13 มิลลิกรัม/100 กรัมคิดเป็น 51.38 ± 8.69 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ Leucine Phenylalanine Glutamic acid และ Proline มีปริมาณเท่ากับ 22.64 ± 0.83, 17.27 ± 0.95, 15.53 ± 3.0 และ15.01 ± 0.25 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 7.87 ± 0.29, 6.0 ± 0.33, 5.40 ± 1.04 และ 5.22 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดอะมิโนมีค่าเท่ากับ 17.92 ± 0.25 มิลลิกรัม/100 กรัมคิดเป็น 6.23 ± 1.13

เปอร์เซ็นต์ คลอลาเจนที่สกัดได้จากกระดูกมีปริมาณ Lysine มากที่สุด คือ 72.82 ± 61.32 มิลลิกรัม/ 100 กรัม คิดเป็น 13.38 ± 10.71 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ Proline, Leucine, Phenylalanine, Glysine และGlutamic acid มีปริมาณเท่ากับ 66.63 ± 56.75, 57.63 ± 46.35, 55.71 ± 46.96, 53.83 ± 43.80 และ 52.25 ± 43.10 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 11.64 ± 9.91, 10.06 ± 8.10, 9.73 ± 8.20, 9.40 ± 7.80 และ 9.13 ± 7.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดอะมิโนมีค่าเท่ากับ 83.17 ± 0.56 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 14.59 ± 10.76 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณกรดอะมิโนที่พบสูงในเกล็ด หนังและกระดูก คือ Leucine 20.57±3.55 มิลลิกรัม/100 กรัม Glycine147.81 ± 2.13 มิลลิกรัม/100 กรัมและ Lysine 72.82 ± 61.32 มิลลิกรัม/ 100 กรัมตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Morimura *et al.* (2002) กล่าวว่ากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนที่สกัดจากหนังหมูและหนังปลาที่เป็นเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมี Glycine เป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลัก โดยชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่พบเมื่อจำแนกตามกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจน พบว่าเป็นกรดอะมิโนแบบ non-essential (Swand and Torley, 1991) ปริมาณกรดอะมิโนที่พบในแต่ละเนื้อเยื่อของปลาจะแตกต่างกันไปตามโครงสร้างและหน้าที่ของอวัยวะนั้นโดยปริมาณกรดอะมิโน Hydroxyproline จะมีมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ซึ่งจะมีผลต่อความเสถียรต่อความร้อนของคลอลาเจนด้วย คลอลาเจนจากปลาที่อาศัยอยู่บริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำจะมีปริมาณกรดอะมิโน Hydroxyproline ต่ำกว่าปลาที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง (Sadowska *et al.*, 2003)

ค่าความคงตัวของคลอลาเจนเมื่อพิจารณาตามปริมาณของ Imino acid (Proline + Hydroxyrpoline) โดย Wong (1989) กล่าวว่าปริมาณของ Imino acid ที่มีมากจะให้ความคงตัวของคลอลาเจนมากกว่าคลอลาเจนที่มี Imino acid น้อย จากการทดลองพบว่ากระดูกมีปริมาณ Imino acid สูงกว่าในเกล็ดและหนัง โดยอาจกล่าวได้ว่าคลอลาเจนที่สกัดได้จากกระดูกปลาจีน (*Hypophthalmichthys molitrix*) มีความคงตัวมากกว่าคลอลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดและหนัง ทั้งนี้เพราะโครงสร้างหลักของโมเลกุลของคลอลาเจนถูกรักษาให้คงไว้โดยโครงสร้างทุติยภูมิของสายโซ่โพลีเพปไทด์ที่ถูกกำกับไว้โดยวงแหวน Pyrrolidine ที่เกิดจากการจับกันโดยพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโน Proline และ Hydroxyproline นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงปริมาณ Imino acid โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณ Hydroxyprolineของคลอลาเจนที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของเศษเหลือของปลาจีนจากกระบวนการแปรรูปปลาส้ม พบว่า ปริมาณ Hydroxyproline ของกระดูกยังคงมีค่าสูงสุด คือ 16.54 ± 4.13 มิลลิกรัม/100 กรัม ลักษณะเช่นนี้เป็นสิ่งหนึ่งที่ช่วยบอกให้ทราบว่าคลอลาเจนที่ได้จากการสกัดจากกระดูกมีความได้เปรียบมากกว่าคลอลาเจนที่สกัดได้จากส่วนอื่นในด้าน

การผลิตเจลาตินจากส่วนต่าง ๆ ของปลา ทั้งนี้เนื่องจากปัญหาส่วนใหญ่ของการผลิตเจลาตินจากปลาคือมีความแข็งตัวของเจลต่ำทั้งนี้เนื่องจาก Imino acid ที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนมีปริมาณต่ำ จากการรายงานของ Muyonga *et al.* (2004) ระบุว่า คลอลาเจนจากหนังปลา Nile perch มีความได้เปรียบสำหรับการผลิตเจลาตินเนื่องจากมีปริมาณ Imino acid สูง (19.28 กรัม/100 กรัม) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ Imino acid ที่สกัดได้จากกระดูกที่มีค่าเท่ากับ 14.59 ± 10.76 เปอร์เซ็นต์ ยังคงมีค่าต่ำกว่าคลอลาเจนที่สกัดจากหนังปลา Toadfish (17.0 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าคลอลาเจนที่สกัดได้จากหนังหมู (22.0 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่ระดับการไฮดรอกซิเลชันของ Proline ของคลอลาเจนที่สกัดได้จาก เกล็ด หนังและกระดูกมีค่าเท่ากับ 20.76 19.38 และ 24.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองอื่น ๆ ก่อนนี้ พบว่า คลอลาเจนจากการศึกษานี้มีความทนทานต่อความร้อนค่อนข้างต่ำ โดยคลอลาเจนที่สกัดได้จากกระดูกสามารถทนทานต่อความร้อนได้สูงสุด รองลงมา คือ เกล็ดและหนัง ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาถึงลักษณะ $(Gly\text{-}Pro\text{-}Hyp)_n$ ที่เป็น Triple helical repeat ของคลอลาเจนของเกล็ด หนังและกระดูกมีค่าเท่ากับ 34.73 165.73 และ 137.0 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 21.96 57.61 และ23.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ Type I collagen ของหนังหมูมีค่าเท่ากับ 34.1 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 6 ปริมาณกรดอะมิโนที่พบในคลอลาเจนสกัดในเศษเหลือปลาจีน(*Hypophthalmichthys molitrix*) จากกระบวนการผลิตปลาส้ม

Amino acid profile	ปริมาณ (mg/100 g : wet sample)		
	Scale	Skin	Bone
Alanine	12.53 ± 0.41	10.35 ± 0.20	22.76 ± 16.92
Glycine	16.36 ± 2.81	147.81 ± 2.13	53.83 ± 43.50
Valine	10.49 ± 0.20	9.68 ± 0.63	22.16 ± 16.80
Leucine	21.87 ± 1.77	22.64 ± 0.83	57.63 ± 46.35
Isoleucine	10.29 ± 0.26	10.41 ± 0.13	34.98 ± 29.22
Threonine	<5.00	<5.00	7.32 ± 6.58
Serine	<5.00	<5.00	5.85 ± 5.36
Proline	15.21 ± 0.81	15.01 ± 0.25	66.63 ± 56.75
Arginine	<5.00	<5.00	10.11 ± 9.27
Aspartic acid	13.10 ± 2.29	9.58 ± 0.50	28.61 ± 22.58
Methionine	<5.00	<5.00	14.57 ± 13.24
Hydroxyproline	3.16 ± 0.25	2.91 ± 0.17	16.54 ± 4.13
Glutamic acid	12.70 ± 2.19	15.53 ± 3.00	2.25 ± 43.10
Phenylalanine	16.78 ± 0.94	17.27 ± 0.95	55.71 ± 46.96
Lysine	20.57 ± 3.55	16.36 ± 14.80	72.82 ± 61.32
Histidine	<5.00	<5.00	16.54 ± 14.35
Hydroxylysine	<5.00	<5.00	5.34 ± 4.89
Tyrosine	4.64 ± 0.79	<5.00	28.92 ± 24.90
Tryptophan	<5.00	<5.00	<5.00
Cystine	<5.00	<5.00	<5.00
Imino acid	18.37 ± 0.81	17.92 ± 0.25	83.17 ± 0.56

Inino acid = Proline + Hydroxyrpoline (Wong, 1989)

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษา

การสกัดคลอลาเจนจากเศษเหลือปลาจีน (*Hypophthalmichthys molitrix*) จากกระบวนการผลิตปลาส้มพบว่ากระดูกให้ปริมาณคลอลาเจนสูงสุดรองมาคือเกล็ดและหนัง โดยมีผลได้จากการสกัด เท่ากับ 340.50 ± 37.77, 046.39 ± 2.13 และ 42.77 ± 1.40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ คลอลาเจนที่สกัดได้เป็นชนิด Type I ประกอบด้วย 2 α chains เป็นอย่างน้อย คือ α_1 และ α_2 โดยกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลักเป็นชนิด non – essential amino acid คือ Leucine Lysine Phenylalanine Glycine และ Proline เป็นองค์ประกอบหลักของคลอลาเจนที่ได้จากเกล็ด Glysine Leucine Phenylalanine Glutamic acid และ Proline เป็นองค์ประกอบหลักของคลอลาเจนที่ได้จากหนัง และLysineProline Leucine Phenylalanine Glysine และGlutamic acid เป็นองค์ประกอบหลักของคลอลาเจนที่ได้จากกระดูก ขณะที่ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนที่สกัดได้จากกระดูกมีปริมาณสูงสุด คือ 83.17 ± 0.56 มิลลิกรัม/100 กรัมคลอลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดและหนังมีปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใกล้เคียงกัน คือ 18.37 ± 0.81 และ17.92 ± 0.25 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ ลักษณะเช่นนี้ทำให้คลอลาเจนที่สกัดได้จากกระดูกมีข้อได้เปรียบในการใช้ผลิตเจลลาตินเพราะจะทำให้ได้เนื้อเจลเหนียวและแข็งแรงกว่าคลอลาเจนที่ได้จากเกล็ดและหนัง

ดังนั้นการสกัดคลอลาเจนจากเศษปลาจีนจึงเป็นแนวทางในการลดปัญหาขยะของเสีย และการเพิ่มมูลค่าของเศษปลา อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดให้ได้สารคลอลาเจนบริสุทธิ์จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมทั้งลักษณะและคุณสมบัติของคลอลาเจนที่สกัดได้

MAEJO UNIVERSITY

บรรณานุกรม

นันทพร อัคนิจ, วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, วรรณี จิรภาคย์กุล และ นงนุช รักสกุลไทย. 2550. **ผลของอุณหภูมิและสัดส่วนของกรดต่อการสกัดคลอลาเจนจากหนังปลาสีกุด**. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 45 ประจำปี 2550. กรุงเทพฯ: สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 828 น.

นพวรรณ ฉิ้มสังข์, อารีรัตน์ บุญมี, วัชรี ส่งศรีอ่อน, สตรี ไทยบ่าบาก และ ปิยพงศ์ โชติพันธุ์. 2548. การใช้เศษปลาจากการแปรรูปเป็นอาหารปลานิล. **ว.สงขลานครินทร์วทท.** (ฉบับพิเศษ 1): 141 – 149.

สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. 2551. **การสร้างมูลค่าเพิ่มสินค้าเกษตรโดยใช้การพัฒนาแบบไม่มีการสูญเสีย.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://pcoc.moc.go.th/pcocsys/uploadfile/96/doc/ (28 พฤศจิกายน 2551).

AOAC. 2000. **Official Methods of Analysis.** 14^{th} ed. Washington, D.C: Association of Official Analytical Chemists. 1200 p.

Asghar, A. and R.L. Henrickson. 1982. Chemical, biochemical, functional and nutritional characteristics of collagen in food systems. pp. 231-372. In C.O. Chichester, ed. **Advance in Food Research Vol. 28.** London: Academic press, Inc.

Bailey and Light. 1989. **Connective Tissue in Meat and Meat Products**. London: Elsevier Applied Science. 220 p.

Babu, M., G. Chandrakasan and G. Krisnan. 1980. Observation on difference and composition of collagen in sucker and tentacles of *Sepia officinalis*. **Leather Science (Madras)** 27: 14-19.

Ed Rybicki and Maud Purmes. 1996. **Molecular Biology Techniques Manual: SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).** N.P.: Dept Microbiology University of Cape Town. 76 p.

Foegeding, E. A., Lanier T.C. and Hultin, H. O. 1996. Collagen. In **Food Chemistry.** 3^{rd} ed. pp. 902-906. New york: Marcel Dekker, Inc.

Hassan, F. and Mathew, S. 1996. Distribution of collagen in the muscle tissue of commercially important tropical fishes. **Journal Food Science Technology** 33: 121-123.

Hayachi , T. and Nagai, Y. 1979. Separation of α chain of type I and type III collagen by SDS – polyacrylamide gel electrophoresis. **Biochemistry** 86: 453-459.

Toshiyuki Ikoma, Koayashi Hisatoshi, Tanaka Junzo, Dominic Walsh and Stephen Mann. 2003. Physical properties of type collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus.* **Biological Macromolecules** 32: 199 – 204.

Kimura, S. and Ohno Y. 1987. Fish type I collagen : Tissue specific existence of two molecular form, $(\alpha_1)_2\alpha_2$ and $\alpha_1\alpha_2\alpha_3$, in Alaska pollack. **Comp. Biochemistry Physiol.** 88B: 409-413.

Kimura, S. 1992. Wide distribution of skin type I collagen α_3 chain in bone fish. **Comp. Biochemistry Physiol.** 102B: 255-260.

Kimura, S., X. Zhu, R. Mutsui, M. Shijoh and S. Takamisawa. 1988. Characterization of fish muscle type I collagen. **Food Science** 53: 1315-1318.

Kittiphattanabawon, Phanat. 2004. **Extraction and Charaterization of Collagen and Gelatin from Bigeys Snapper (*Priacanthus tayenus*) Skin and Bone**. Master's thesis. Prince of Songkla University. 141 p.

Kittipatanabowon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai and M. Tanaka. 2005. **Characterization of Acid Soluble Collagen from Skin and Bone of Bigeye Snapper (*Priacentus tayenus*)**. Bangkok: Master's thesis, Kasetsart University. 524 p.

Ledward D.A. 2000. Gelatin In Food Hydrocolloid. pp. 67-86. In. Phillips, G.O. and Williams, P.A. eds. **Biochemistry Physiol.** N.P.: CRC.Boca Raton.

Lee, C. H., A. Singla and Y. Lee. 2001. Biomedical applications of collagen. **Inter Journal of Pharma**. 221:1-22.

L. S. Senaratns, Pyo-Jam Park, Se-Know Kim. Isolution and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloven*) Skin. **Bioresource Technology** 97, (2): 191-197.

Maria, S. and K. Ilona. 2005. Optimum of condition for precipitation of collagen from solution using K-carraginan. Study on collagen from skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**. 91: 45-49.

Matsui, R., M. Ishida and S. Kimura. 1991. Characterization of two distinct type I – like collagen from lamprey (*Entosphenus jatonicus*). **Comp. Biochemistry Physiol.** 95B: 669-675.

Mizuta, S., J. Hwang and R. Yoshinaka. 2002. Molecular species of collagen from wing muscle of skate (*Raja kenojei*). **Food Chemistry** 76: 53 – 58.

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

Muyonga, J.H., C.G.B. Cole and K.G. Duodu. 2004. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lated niloticus*). **Food Chemistry** 85: 81–89.

Nagai, T. and N. Suzuki. 2000. Isolation of collagen from fish waste material – skin., bone and fins. **Food Chemistry** 68: 277-281.

Nagai, T., W. Worawattanamateekul, N. Suzuki, T. Nakamura, T, Ito, K. Fujiku, M. Nakao and T. Yano. 2002. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*). **Food Chemistry** 70: 205-208.

Nalinanon Prodpran, Amjad Balange and Sottawat Benjakul. **Food Chemistry** 133(1): 61-70.

Nishimoto, M.,Sakamoto, R., Mitzuta, S. and Yoshinaka, R. 2005. Identiication and characterization of molecular species of collagen in ordinary muscle and skin of Japanese flounder *Paralichthys oliveaceus*. **Food Chemistry** 90: 151-156.

Noitup, Paweenee. 2004. **Collagen Extraction from Fish Skin By-Product in the Frozen Fish Industry:Study of Some Characteristics of Extracted Collagen**. Bangkok: Dissertation approval graduate school, Kasetsart University. 88 p.

Nomura, Y., H. Sakai, Y. Ishii and K. Shirai. 1996. Preparation and some properties of type I collagen from fish scale. **Bioscience. Biotechnology and Biochemistry** 60: 2092-2094.

Ockerman, H.W. and C.L. Hansen. 2000. **Animal By-Product Processing and Utilization**. Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc. 250 p.

Ogawa,M., M.W. Moody, R.T. Portier, J. Bell, M.A. Schexnayder and J.N Losso. 2003. Biochemical properties of black drum and sheep head seabream skin collagen. **Agricultural and Food Chemistry** 51: 8088-8092.

Plasticsurgery. 2002. Everyday wounds. **Plastic Surgery** [Online] Available http:\\www.plasticsurgery.org/profino/everydaywounds/edwchapter2.htm. (17 October 2002)

Regenstein, J.M. and C.E. Regenstein. 1991. **Introduction to Fish Technology** New York: Van Nostrand Reinhold. 150 p.

Rodziewicz-Motowidlo S., A. Slasewska, E. Mulkiewicz, A. Kolodziejczyk, A. Aleksandrowicz, J. Miszkiewicz and P. Stepnowski. 2008. Isolation and characterization of a thermally stable collagen preparation from the outer skin of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. **Aquaclture** 26: 523 – 527.

Rui Duan, Junjie Zhang, Xiuqiao Du, Xingcun Yao and Kunihiko Konno. 2008. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). **Food Chemistry** 112: 702 - 706.

Sadowska , M., I. Kolodziejska and C. Niecikowska. 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry** 130: 1-2.

Saito, M., N. Kunisaki, N. Urano and S. Kimura. 2001. Collagen as edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). **Food Science** 67: 1319-1322.

Sidorska, Z.E., A. Kolakowska and B.S. Pan. 1990. The nutritive composition of the major groups of marine food orgamisms. p. 29-54 <u>In</u> Nutritional composition, and Preservation. (Sikorski, Z.E., ed.). **Seafood Resources** Florida: CRC press, Inc.

Swand, J.E. and P.J.Torley. 1991. Collagen: Structure, Function and Uses. pp. 120-136. <u>In</u> **Meat Industry Research**. Hamilton: Institute of New Zealand (Inc.).

Takeshi, N. and S. Nobutuka. 2000. Isolation of collagen from fish raste material-skin, bone and fins. **Food Chemistry** 68: 277 - 281.

Usha, R. and T. Ramasami. 2004. The effect o urea and n- propanol on collagen denaturation : Using DSC circular dicroism and viscosity. **Thermochimika Acta** 409(2): 201-206.

Vasantha, R., P.K. Segal and K.P. Roa. 1988. Collagen ophthalmic insert for pilocarpine drug derivery system.Int. **Biotechnology and Biochemistry** 267: 2650-2655.

Walter , R.J., T. Matsuda, H.M. Reyes, J.M. Walter and M. Hanumadass. 1998. Characterizltion of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. **Burns** 24: 104 - 113.

Wong, D W. S. 1989. **Mechanism and Theory in Food Chemistry** New York: Van Nostr and Reinhold. 320 p.

Xu, Y., M. Bhate and B. Brodsky. 2002. Characterization of nucleation step and holding of collagen triple helix peptide. **Biochemistry** 42: 8143-8151.

Yata M., C. Yochida, S. Fujisawa, S. Misuta and R. Yochinaka. 2001. Identification and characterization of molecular species of collagen in fish skin. **Food Science** 66: 247-251.

Yoshinska,R. and Mizuta, S. 1999. Collagen Type in aquatic molluses and crustaceans. pp. 31-43. In **extracellularmatrix of Fish and Shell Fish.** New York: The Haworth Press. Inc.

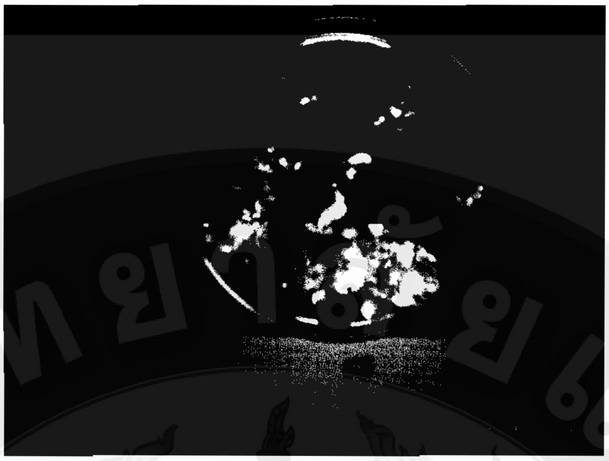
Zhang, Z. K., Li, G.Y., and B. Shi. 2007. Physicochemical properties of collagen gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine lime split wates. **Society of Leather Technologists and Chemistry** 90: 23-28.

MAEJO UNIVERSITY

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

เศษเหลือปลาจีนและการสกัดคลอลาเจน



(a)

(b)

(c)

ภาพ 6 เศษเหลือปลาจีนจากกระบวนการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยาที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดคลอลาเจนจากส่วนต่าง ๆ คือ (a) เกล็ด (b) หนัง และ (c) กระดูก

MAEJO UNIVERSITY

ภาพ 7 การสกัดคลอลาเจนจากเกล็ดปลาจีนเศษเหลือจากการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

ภาพ 8 การสกัดคลอลาเจนจากหนังปลาจีนเศษเหลือจากการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

ภาพ 9 เครื่องสำหรับการศึกษา SDS-PAGE ของคลอลาเจนที่สกัดได้จากเศษเหลือปลาจีนจากการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้ม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

ภาพ 10 เครื่อง GC-MS ที่ใช้ในการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคลอลาเจนที่สกัดได้จาก เกล็ด หนัง และกระดูก เศษเหลือปลาจีนจากการผลิตปลาส้มของกลุ่มเกษตรกรผลิตปลาส้มอำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

ภาคผนวก ข

ประวัติผู้เขียน

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นางสาวน้ำเพชร ประกอบศิลป์	
เกิดเมื่อ	16 พฤศจิกายน 2523	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2538	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนไหล่หินวิทยาคม จังหวัดลำปาง
	พ.ศ. 2541	มัธยมศึกษาตอนปลาย บริหารธุรกิจและการบัญชี โรงเรียนเกาะคาวิทยาคม จังหวัดลำปาง
	พ.ศ. 2544	ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง (ปวส.) สาขาการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตลำปาง จังหวัดลำปาง
	พ.ศ. 2546	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2546 – 2548	ลูกจ้างชั่วคราว ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2549	ลูกจ้างชั่วคราว ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2550-ปัจจุบัน	ลูกจ้างชั่วคราว ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่