รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล

Free radical scavenging activity of marine fish scales collagen

ศรัญญา ยิ้มย่อง

ธันย์ชนก ศิริรักษ์

สิริกุล กวมทรัพย์

ณิษา สิรนนท์ธนา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากกองทุนวิจัยและพัฒนา

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

สัญญาเลขที่ 001/2565

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล

Free radical scavenging activity of marine fish scales collagen

ศรัญญา ยิ้มย่อง

ธันย์ชนก ศิริรักษ์

สิริกุล กวมทรัพย์

ณิษา สิรนนท์ธนา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากกองทุนวิจัยและพัฒนา

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

พฤษภาคม 2566

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัยและพัฒนา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 เลขที่สัญญา 001/2565

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล

ศรัญญา ยิ้มย่อง[1]*, ธันย์ชนก ศิริรักษ์[2], สิริกุล กวมทรัพย์[3], และ ณิษา สิรนนท์ธนา[1]

[1]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131, ประเทศไทย

[2]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 22170, ประเทศไทย

[3]คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 22170, ประเทศไทย

บทคัดย่อ

ในกระบวนการผลิตปลามักมีเศษวัสดุเหลือทิ้งอย่างเช่นเกล็ดปลาซึ่งเป็นแหล่งของคอลลาเจน ดังนั้น จึงทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี การสกัดคอลลาเจนที่ละลายได้ในกรดอ่อนร่วมกับคลื่นไมโครเวฟ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล โดยเกล็ดปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เกล็ดปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*) และเกล็ดปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 48.13 - 55.05 และมีปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 0.05 - 0.07 ปริมาณกรดไขมันในเกล็ดปลาทะเล พบองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (SFAs) มากที่สุด อยู่ในช่วง 39.59 - 48.91 %TFA โดยมีกรดปาล์มิติก (16:0) และกรดเฮปตาเดคาโนอิก (17:0) เป็นชนิดเด่น ตามด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFAs; 3.10 - 8.99 %TFA) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs; 1.09 - 4.62 %TFA) การวิเคราะห์สารสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอ่อนร่วมกับคลื่นไมโครเวฟด้วยเทคนิค FTIR พบจำนวน 5 พีค ได้แก่ amide A พบที่เลขคลื่น 3281.10 cm^{-1} amide B พบที่เลขคลื่น 2935.61 cm^{-1} amide I พบที่เลขคลื่น 1628.22 cm^{-1} amide II พบที่เลขคลื่น 1547.99 cm^{-1} และ amide III พบที่เลขคลื่น 1237.76 cm^{-1} กรดอะมิโนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล พบกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูง 3 อันดับแรก คือ ไกลซีน โพรลีน และ อะลานีน และการศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS–PAGE เปรียบเทียบกับคอลลาเจนบริสุทธิ์พบว่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลเป็นชนิดที่ 1 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล พบว่าการสกัดด้วยกรดอ่อนร่วมกับคลื่นไมโครเวฟให้สารสกัดคอลลาเจนที่มีฤทธิ์ดีกว่าการสกัดด้วยกรดอ่อนร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค โดยสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.75 และ 14.31 mg/ml ในขณะที่ สารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.38 และ 3.11 mg/ml ดังนั้น จะเห็นได้ว่าสารสกัดคอลลาเจนที่ละลายได้ในกรดอ่อนจากเกล็ดปลากะพงขาวและเกล็ดปลาช่อนทะเล สามารถเป็นแหล่งทางเลือกของการผลิตคอลลาเจนที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ: เกล็ดปลาทะเล คอลลาเจน และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Free radical scavenging activity of marine fish scales collagen

Sarunya Yimyong[1*], Thanchanok Sirirak[2], Sirigoon Kuamsub[3], and Nisa Siranonthana[1]

[1]Institute of Marine Sciences, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

[2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

[3]Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

ABSTRACT

The fish processing by-products produce large amounts of fish waste such as scales of fish which are rich in collagen. Chemical composition, acid-soluble collagen (ASC) extraction with the microwave-assisted process, and free radical scavenging activity of marine fish scales collagen were investigated. Fish scales of *Lates calcarifer*, *Epinephelus malabaricus* and *Rachycentron canadum* showed the total protein ranging from 48.13 to 55.05 % and the lowest total lipids ranged between 0.05 and 0.07 %, respectively. Marine fish scales contained total saturated fatty acid (SFAs) ranging from 39.59 to 48.91 %TFA, palmitic acid 16:0 and heptadecanoic acid 17:0 were the dominant SFAs, following monounsaturated fatty acids (MUFAs; 3.10 - 8.99 %TFA), and polyunsaturated fatty acids (PUFAs; 1.09 - 4.62 %TFA). The chemical structural property of ASC was characterized by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy appearing with five spectral intervals absorption of amide A (3281.10 cm^{-1}), amide B (2935.61 cm^{-1}), amide I (1628.22 cm^{-1}), amide II (1547.99 cm^{-1}), and amide III (1237.76 cm^{-1}), respectively. The amino acid profile of ASC had glycine as the major amino acid followed by proline and alanine, respectively. The SDS-PAGE pattern showed the typical features of type I collagen. In addition, ASC with the microwave-assisted process showed good scavenging activities on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical of *L. calcarifer* (IC_{50} 12.75 and 14.31 mg/mL, respectively) and 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical of *R. canadum* (IC_{50} 0.38 and 3.11 mg/mL, respectively). Therefore, the ASC of *L. calcarifer* and *R. canadum* can be used as an alternative source of collagen with antioxidant properties.

Keywords: marine fish scales, collagen, and antioxidant properties

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
บทนำ	1 - 3
การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	4 - 13
วิธีดำเนินการวิจัย	14 - 25
ผลการวิจัย	26 - 32
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	33 - 37
เอกสารอ้างอิง	38 - 44

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วิธีการสกัด ชนิด และผลผลิตที่ได้ของคอลลาเจนจากส่วนต่างๆของปลา	6 - 7
2	วิธีการหรือขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา	8 - 9
3	คุณค่าทางอาหารของเกล็ดปลาทะเล คิดเป็นร้อยละกรัมของน้ำหนักแห้ง (Mean±SD)	25
4	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างเกล็ดปลาทะเล mean±SD (%TFA) dry wt.	27 - 28
5	ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่ละลายได้ในกรดอ่อนจากเกล็ดปลาทะเล ภายใต้สภาวะการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง	28
6	ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวและเกล็ดปลาช่อนทะเล	29
7	องค์ประกอบกรดอะมิโนของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล	31 - 32

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของคอลลาเจน (Sobczak-Kupiec et al., 2021)	4
2	ขั้นตอนโดยสรุปสำหรับการสกัดคอลลาเจน (Salvatore et al., 2020)	7
3	สเปกตรัมของ FTIR ในโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนชนิดที่ 1 3 4 5 และ 6 (Belbachir et al., 2009)	10
4	เกล็ดปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*)	14
5	เกล็ดปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)	14
6	เกล็ดปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*)	14
7	เครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy	24
8	โครงสร้างโมเลกุลของเกล็ดปลากะพงขาว ก่อนทำการสกัดคอลลาเจน	30
9	โครงสร้างโมเลกุลของเกล็ดปลากะพงขาว หลังทำการสกัดคอลลาเจน	30
10	รูปแบบโปรตีนคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลาทะเลโดยใช้เทคนิค SDS–PAGE (Lane A = protein marker; Lane B = crude extracted collagen from a marine fish scale)	32

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในอุตสาหกรรมประมง ปลาเป็นหนึ่งในกลุ่มสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมบริโภคภายในประเทศและสร้างรายได้จากการส่งออกเป็นอันดับต้นๆ สำหรับกระบวนการแปรรูปปลานั้น มักมีวัสดุเศษเหลือทิ้งประมาณร้อยละ 20-80 ของวัตถุดิบเริ่มต้น ขึ้นอยู่กับชนิดปลาและขั้นตอนกระบวนการ ได้แก่ เกล็ดปลา หนังปลา ไส้ปลา หัวปลา และก้างปลา (Ahmed, Verma and Patel, 2020) ซึ่งจัดว่าเป็นขยะส่วนใหญ่ของอุตสาหกรรมอาหารและการประมงที่มีต้นทุนในการกำจัดทิ้งและอาจสร้างปัญหาให้กับสิ่งแวดล้อมหากไม่มีการบริหารจัดการที่ดี ถึงแม้ว่าปัจจุบันเศษเหลือทิ้งจากการแปรรูปสัตว์น้ำส่วนใหญ่ถูกนำใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และการทำปุ๋ย แต่ยังนับว่ามีมูลค่าค่อนข้างต่ำ (ปวเรศวร์, 2563) จึงมีแนวคิดที่จะนำเศษเหลือทิ้งจากปลาทะเลอย่างเกล็ดปลามาศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มมูลค่าให้สูงขึ้นด้วยการสกัดเป็นคอลลาเจน (Collagen) เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Hashim et al., 2015) อุตสาหกรรมยา วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) และชีวการแพทย์ (Silvipriya et al., 2015) นอกจากนี้ ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากเศษวัสดุเหลือทิ้งสอดคล้องตามแผนการพัฒนาประเทศที่ยั่งยืนด้วยโมเดลเศรษฐกิจ BCG (Bio-Circular-Green Economy) ที่ให้ความสำคัญกับการจัดการของเสียจากการผลิตและบริโภค ด้วยการนำวัตถุดิบที่ผ่านการผลิตและบริโภคแล้วเข้าสู่กระบวนการแปรสภาพเพื่อกลับมาใช้ใหม่ (Recycle, Upcycle) ซึ่งต่างจากระบบเศรษฐกิจแบบดั้งเดิม ที่เน้นการใช้ทรัพยากร การผลิต และการสร้างของเสีย (Linear Economy) (กระทรวงการอุดมศึกษาวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม, 2564)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจนำเกล็ดปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เกล็ดปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*) และเกล็ดปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) มาศึกษาชนิดและปริมาณคอลลาเจน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจน รวมถึงคุณค่าทางอาหารและกรดไขมันซึ่งอาจเป็นแหล่งโปรตีนและกรดไขมันจำเป็น เพื่อการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทิ้งทางการประมงและสามารถเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกรดไขมันของเกล็ดปลาทะเล
2. ศึกษาชนิด ปริมาณ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เกล็ดปลาทะเลที่นำมาศึกษา ได้แก่ ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*) และปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) เป็นต้น จากตลาดทรัพย์สิน จังหวัดชลบุรี

2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาทะเล ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า (AOAC, 1995) วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเทคนิค GC-FID

3. สกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาว เกล็ดปลาเก๋า และเกล็ดปลาช่อนทะเล ด้วยการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคและคลื่นไมโครเวฟ

4. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาว เกล็ดปลาเก๋า และเกล็ดปลาช่อนทะเล ด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (Diphenylpicryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) และอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical scavenging assay)

5. วิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยการดูดกลืนแสงยูวี (UV absorption) และศึกษาชนิดคอลลาเจนโดยใช้เทคนิค Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE)

6. ศึกษาโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดอะมิโน (Amino acid profile) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas chromatograph, GC) หรือ HPLC

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเกล็ดปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เกล็ดปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*) และเกล็ดปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) จากตลาดทรัพย์สิน จังหวัดชลบุรี มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาเพื่อกำจัดเมือกและกลิ่นคาว แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นนำไปตากแห้งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเป็นตัวอย่างสำหรับทำการทดลอง

2. วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลากะพงขาว ปลาเก๋า และปลาช่อนทะเล ได้แก่ ปริมาณโปรตีนด้วย Kjeldahl Method ปริมาณไขมัน ความชื้น และเถ้า (AOAC, 2000) รวมทั้งการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Christie, 2003)

3. กำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาว เกล็ดปลาเก๋า และเกล็ดปลาช่อนทะเล ด้วยกรดอะซิติกร่วมกับการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคหรือคลื่นไมโครเวฟ (ดัดแปลงจาก ทนงศักดิ์, 2556; มะลิวัลย์ และคณะ, 2558; Jin et al., 2019)

4. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาว เกล็ดปลาเก๋า และเกล็ดปลาช่อนทะเล ด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) (Fenglin et al., 2004) และอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS) (Yang et al., 2011)

5. วิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยการดูดกลืนแสงยูวี และศึกษาชนิดคอลลาเจนโดยใช้เทคนิค SDS–PAGE (Laemmli, 1970)

6. ศึกษาโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนด้วยเทคนิค FTIR (Belbachir et al., 2009) และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ หรือ HPLC

7. วิเคราะห์ สรุปผลการทดลอง และเขียนเป็นงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

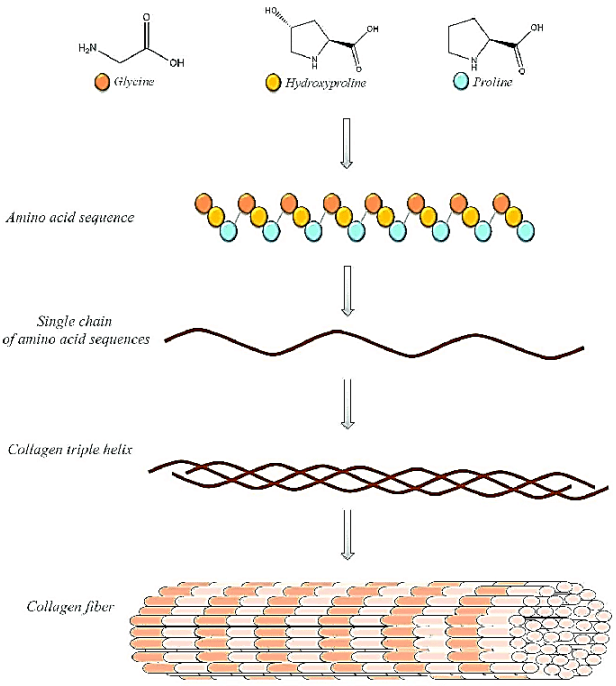
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีและกรดไขมันของเกล็ดปลากะพงขาว เกล็ดปลาเก๋า และเกล็ดปลาช่อนทะเล ที่เป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทิ้งทางการประมง
2. ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล ได้แก่ วิธีการสกัดคอลลาเจน ชนิดของคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจน เป็นต้น ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือทิ้งทางการประมง

การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. คอลลาเจน (Collagen)

คอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหนึ่งของสารเคลือบเซลล์ (Extracellular metrix; ECM) มีลักษณะโครงสร้างเป็นโปรตีนเส้นใยของเนื้อเยื่อยึดเหนี่ยว (Connective tissue) ได้แก่ ผิวหนัง เอ็น กระดูก กระดูกอ่อน และหลอดเลือด เป็นต้น ซึ่งพบมากถึงร้อยละ 25-35 ของโปรตีนทั้งหมดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ไม่ละลายน้ำ ทำหน้าที่เพิ่มความแข็งแรงและความยืดหยุ่นให้แก่อวัยวะต่างๆ ภายในร่างกาย โดยร่างกายสามารถผลิตคอลลาเจนได้มากในขณะที่เรามีอายุน้อย และจะลดปริมาณการผลิตคอลลาเจนลงเมื่ออายุมากขึ้น ปัจจุบันเรารู้จักคอลลาเจนที่มีความแตกต่างกันถึง 29 ชนิด โดยร้อยละ 80-90 เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 2 และ 3 โครงสร้างของคอลลาเจนประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 3 สาย (Triple helix) พันกันเป็นเกลียว แต่ละสายโพลีเปปไทด์เรียกว่า สายแอลฟา (α-Chain) มีกรดอะมิโนมากกว่า 1,000 ตัว เรียงต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ (Peptide bond) โดยพบลำดับการเรียงกันของกรดอะมิโนในรูปแบบ X-Y-Gly ซ้ำๆกัน โดยที่ X คือ โพรลีน (Proline) Y คือ ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) และไกลซีน (Glycine) อยู่ในทุกๆตำแหน่งที่สามของลำดับกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ พันธะที่พบมากและมีความสำคัญต่อความคงตัวของคอลลาเจน คือ พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ส่วนคอลลาเจนที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เรียกว่า เจลาติน (Gelatin) และเมื่อทำให้มีขนาดอนุภาคเล็กลงด้วยเอนไซม์ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Collagen hydrolysate) เช่น คอลลาเจนไตรเปปไทด์ (Collagen tripeptide) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการดูดซึมที่ดียิ่งขึ้น (Jafari et al., 2020; Hashim et al., 2015; Silvipriya et al., 2015)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของคอลลาเจน (Sobczak-Kupiec et al., 2021)

ชนิดของคอลลาเจนที่พบโดยทั่วไป (Silvipriya et al., 2015)

คอลลาเจนชนิดที่ 1 (Collagen type I) พบมากถึง 90% ของคอลลาเจนทั้งหมดในร่างกาย บริเวณผิวหนัง กระดูก ฟัน ผนังหลอดเลือด เอ็นและเอ็นยึดกล้ามเนื้อ กระจกตา และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีความสำคัญในเรื่องของการเพิ่มความยืดหยุ่น ป้องกันเนื้อเยื่อไม่ให้ฉีกขาด และช่วยสมานแผลบนผิวหนัง

คอลลาเจนชนิดที่ 2 (Collagen type II) พบมากในกระดูกอ่อน เช่น ส่วนประกอบของหู จมูก หลอดลม กระดูกซี่โครง กระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อ และหมอนรองกระดูกสันหลัง

คอลลาเจนชนิดที่ 3 (Collagen type III) มักพบร่วมกับชนิดที่ 1 คือ พบในผิว กล้ามเนื้อ ผนังหลอดเลือด และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในร่างกาย

คอลลาเจนชนิดที่ 4 (Collagen type IV) พบบริเวณเนื้อเยื่อประสานที่รองรับเนื้อเยื่อบุผิวในส่วนของ Epithelium-secreted layer

คอลลาเจนชนิดที่ 5 (Collagen type V) เป็นองค์ประกอบของเยื่อบุเซลล์ต่างๆ พบในผิวของเซลล์และเส้นผม และเนื้อเยื่อบริเวณรกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

1.1 แหล่งของคอลลาเจน

ในอุตสาหกรรมนิยมใช้สัตว์จำพวกวัว (Bovine animals) และสัตว์จำพวกหมู (Porcine) เป็นแหล่งของคอลลาเจน โดยใช้ส่วนของหนังและกระดูกจากวัว ควาย และหมู แต่พบปัญหาเกี่ยวกับโรคติดต่อจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เช่น โรคปากและเท้าเปื่อยในโค (Foot and Mouth Disease; FMD) โรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy; BSE) และอาการแพ้ในประชากรคิดเป็น 3% เป็นต้น และยังมีความเชื่อทางศาสนาที่ไม่บริโภคเนื้อหมู จึงทำให้กลุ่มสัตว์น้ำทั้งน้ำจืดและน้ำเค็มเป็นแหล่งทางเลือกของคอลลาเจนที่น่าสนใจ (Ahmed, Verma and Patel, 2020; Zata, Chiquita and Shafira, 2020) เนื่องด้วยสามารถสกัดได้ง่าย มีปริมาณคอลลาเจนสูง โมเลกุลขนาดเล็กดูดซึมเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ง่าย มีความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีการปนเปื้อนของสารพิษน้อยมาก (Jafari et al., 2020)

สัตว์ทะเล (Marine animals) สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ ปลา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เป็นต้น และกลุ่มสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ กุ้ง ฟองน้ำทะเล แมงกะพรุน ปลาหมึก เม่นทะเล ดาวทะเล และดอกไม้ทะเล เป็นต้น ซึ่งพบการศึกษาคอลลาเจนจากกลุ่มสัตว์ทะเลมากมาย อาทิ การสกัดและคุณสมบัติของคอลลาเจนจากปลิงทะเล (*Holothuria cinerascens*) เพื่อการประยุกต์ใช้เป็นสารรักษาความชุ่มชื้นในเครื่องสำอาง (Li et al., 2020) การศึกษาคุณสมบัติของคอลลาเจนจากปลาหมึกด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน (Cao et al., 2022) และการสกัดฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากแมงกะพรุน (*Rhopilema hispidum*) (Aziz et al., 2021) เป็นต้น นอกจากนี้ วัสดุเศษเหลือทิ้งทางการประมงโดยเฉพาะจากปลา เช่น หนังปลา เกล็ดปลา ก้างปลา และครีบ ยังพบความเป็นไปได้สำหรับเลือกใช้เป็นแหล่งของคอลลาเจน ทั้งนี้ ปริมาณคอลลาเจนมักพบมากที่สุดในหนังปลาแต่ข้อเสียของคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลา คือ หนังปลามีสีคล้ำและมีไขมันมาก จึงจำเป็นต้องใช้สารเคมีช่วยในการ

ฟอกสีและล้างไขมัน (Pang, Chang and Woo, 2013) ซึ่งมีรายงานสรุปเกี่ยวกับการสกัดคอลลาเจนจากปลา รวมทั้งคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดได้และการประยุกต์ใช้ทางวิศวกรรมชีวการแพทย์ (Jafari et al., 2020) และมีการศึกษาคอลลาเจนจากส่วนต่างๆของปลา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วิธีการสกัด ชนิด และผลผลิตที่ได้ของคอลลาเจนจากส่วนต่างๆของปลา

Fish species	Fish sources	Extraction	Yields	Type of collagen	References
Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) Seer fish (*Scomberomorus commerson*) Asian sea bass (*Lates calcarifer*)	Skin	Acid-soluble collagen (ASC)	61.26% Yellowfin tuna; 58.21% Seer fish; 59.31% Asian sea bass	Type I	Ampitiya et al., 2023
Tilapia (*Oreochromis niloticus*)	Scales	ASC with ultrafine bubbles	1.58%	Type I	Kuwahara, 2021
Carp (*Cyprinus carpio*)	Scales	ASC	9.79% wet weight	Type I	Bhagwat and Dandge, 2016
Fish (*Arothron stellatus*)	Skin	ASC	80% dry weight	Type I	Ramanathan et al., 2014
Trash fish, leather jacket (*Odonus niger*)	Skin Bone muscle	Acid-soluble collagen (ASC) Pepsin-soluble collagen (PSC)	46 - 50% ASC; 49 - 58% both ASC and PSC; 64 - 71% PSC	Type I (skin and bone); Type V (muscle)	Muralidharan et al., 2013
Lizard fish (*Saurida* spp.), Horse mackerel (*Trachurus japonicus*) from Japan and Vietnam; Grey mullet (*Mugil cephalis*), Flying fish (*Cypselurus melanurus*), Yellowback seabream (*Dentex tumifrons*) from Japan	Scales	ASC	0.43 - 1.5% dry weight	Type I	Thuy, Okazaki and Osako, 2014

Oil sardines (*Sardinella longiceps*)	Scales	ASC PSC	1.25% ASC; 3% PSC	Type I	Muthumari, Anand and Maruthupandy, 2016

1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนประกอบด้วยสองขั้นตอนหลัก คือ การกำจัดสารที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น ไขมัน และการสกัดคอลลาเจน ซึ่งมีวิธีการหรือเทคโนโลยีในการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาหลากหลาย ได้แก่ การใช้กรด เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดซิตริก (Citric acid) และกรดแลคติก (Lactic acid) เป็นต้น การใช้ด่าง เช่น แคลเซียมออกไซด์ (Calcium oxide, CaO) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide, $Ca(OH)_2$) และโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3) เป็นต้น การใช้เอนไซม์ เช่น ปาเปน (Papain) โปรติเอส (Protease) และเปปซิน (Pepsin) เป็นต้น (Suo-Lian, Huai-Bin and Dong-Jiao, 2017) รวมทั้งการใช้คลื่นอัลตร้าซาวด์ (Ultrasound waves) หรือคลื่นไมโครเวฟ (Microwave) ช่วยในการสกัดคอลลาเจน (Mirzapour-Kouhdasht et al., 2019) คอลลาเจนมักมีสารกลุ่มไขมัน สารสี และโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนปะปนอยู่ รวมทั้ง แคลเซียม ซึ่งนิยมใช้กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระแอซีติก (Ethylene diaminetetraacetic acid) เรียกอย่างสั้นว่า EDTA สำหรับการกำจัด ก่อนการสกัดคอลลาเจนซึ่งนิยมใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือใช้กรดอะซิติกร่วมกับเอนไซม์ในการสกัด ซึ่งสามารถแบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆได้ดังนี้ (1) การคัดแยกและทำความสะอาดตัวอย่าง (2) การลดขนาดของตัวอย่าง เช่น หั่น สับ และบด เป็นต้น (3) การกำจัดองค์ประกอบที่ไม่ใช่คอลลาเจน เช่น ไขมัน และโปรตีนอื่นๆ เป็นต้น (4) การสกัดคอลลาเจน และ (5) การทำให้บริสุทธิ์ เช่น การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ไดอะไลซิส (Dialysis) และไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization) หรือ Freeze dry เป็นต้น (Schmidt et al., 2016; Salvatore et al., 2020; Ahmed, Verma and Patel, 2020; Coppola et al., 2020) ภาพที่ 2 นอกจากนี้ มีการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการหรือขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลามากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2

ภาพที่ 2 ขั้นตอนโดยสรุปสำหรับการสกัดคอลลาเจน (Salvatore et al., 2020)

ตารางที่ 2 วิธีการหรือขั้นตอนในการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา

Fish scale sources	Pre-treatment	Extraction process	References
Labeo rohita (Rohu) *Catla catla* (Catla)	Washing in a solvent system at pH 7.5 containing 1.0 M NaCl, 0.05 M Tris HCl, 20.0 mM EDTA for a period of 48 h to remove unwanted proteins; Demineralization by treating for 48 h with 0.5 M EDTA solution at pH 7.4	Acid hydrolysis with 0.5 M acetic acid solution at pH 2.5 for 48 h; Adding 0.9 M NaCl to induce salting out of collagen and kept for 24 h; Centrifugation at 8000 rpm for 1 h and re-solubilized in 0.5 M acetic acid; Centrifugation again; Dialysis and freeze-drying	Pati, Adhikari and Dhara, 2010
Golden carp (*Probarbus jullieni*)	Immersion in 0.1 M NaOH at the scale/alkaline solution ratio of 1:10 (w/v) for 8 h which freshly replaced alkaline solution for every 4 h; Washing with iced water and adjusting to the neutral pH; Demineralisation by using 0.5 M EDTA-2Na salt solution of pH 7.4 at the ratio of 1:10 (w/v) under the stirring condition for 48 h with freshly replaced EDTA after 24 h; Washing with iced water and adjusting to the neutral pH	Acid hydrolysis with 0.5 M acetic acid with the scale/acid solution ratio of 1:15 (w/v) for 48 h under stirring condition Filtration; Adding 0.05 M tris (hydroxymethyl) aminomethane (pH 7.0) and NaCl to obtain a concentration of 2.5 M; Centrifugation; The pellet was redissolved in 0.5 M acetic acid and dialysed with 20 volumes of 0.1 M acetic acid for 48 h, dialysed in 20 volumes of double distilled water for 72 h; Freeze-drying	Ali, Benjakul and Kishimura, 2017
freshwater fish scales from local markets in the area of Vinh Yen town, Vinh Phuc province, Viet Nam	Immersion in NaOH 0.1 M solution for 8 h under mechanical stirring; Washing with pure water before immersing in the mixture of HCl 0.2 M and H_2SO_4 0.5 M solutions for 30 min under mechanical stirring; Washing with pure water and distilled water	Extraction with 0.5 M acetic acid solution containing pepsin (1, 2, and 3 wt.%) and ultrasonic for 24 h; Filtration; Adding 10 wt.%/vol NaCl; Centrifugation; Dialysis for 48 h; Freeze-drying	Chinh et al., 2020
Giant groupers (*Epinephelus lanceolatus*) Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)	Soaking in a 1.2 N HCl solution at a ratio of 1:6 (w/v) at a room temperature of 27±2°C for 6 h; Washing with deionized water until the pH 7; Soaking in 0.1 N NaOH solution at a ratio of 1:5 (w/v) which changed every 2 hours until 6 h; Washing with deionized water until the pH 7;	**Acid hydrolysis** with 0.5 M acetic acid, 90 °C, 3-9 h, cooled down to 37°C and adjusted to pH 2; **Enzymatic hydrolysis** with 1% w/w pepsin, 37 °C, 0-48 h, cooled down to 4°C for 30 min; Filtration; Centrifugation; Adding NaCl to obtain a concentration of 1.5 mol/L; Centrifugation; Redissolving in a 0.5 M acetic acid at a ratio of 1:4 (w/v) and dialysis with deionized water; Freeze-drying	Upasen et al., 2019

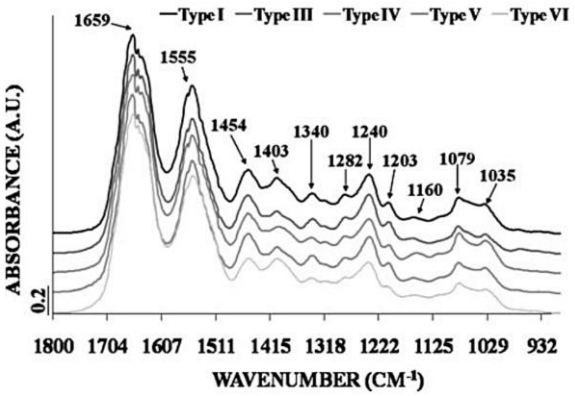
Oil sardines (*Sardinella longiceps*)	Immersion in 10 wt% of NaCl solutions with stirring for 24 h; Demineralization with 0.4 M HCl solution (dry scales:solution = 1:15) for 90 min; Washing with distilled water until the neutral pH	**Acid hydrolysis** with 0.5 M acetic acid for 4 days; Centrifugation; Adding NaCl to a final concentration of 0.7 M and kept at 4 °C overnight Centrifugation; Redissolving in a 0.5 M acetic acid at a ratio of 1:9 (w/v) and dialysis with 100 volumes of 0.1 M acetic acid, followed by distilled water; Freeze-drying **Enzymatic hydrolysis** with 0.5 M acetic acid containing porcine pepsin (40 unit/g of residue) with a solid to solvent ratio of 1:15 (w/v); Filtration; Dialysis; Freeze-drying	Muthumari, Anand and Maruthupandy, 2016
Pacific saury (*Cololabis saira*)	Incubation for 1 week in a solution consisting of 50 mM Tris HCl (pH 7.5) and 20 mM Na-EDTA; Washing with distilled water	Incubation for 2 days in solution consisting of 500 mM acetic acid and 0.5% (w/v) pepsin; Adding NaCl solution to generate a final concentration of 0.7 M; Addition of pepstatin A (5 μl/ml) and incubation overnight; Centrifugation; Redissolving in 500 mM acetic acid solution	Mori et al., 2013

1.3 การศึกษาคุณสมบัติของคอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโพลิเมอร์ของสายโพลีเปปไทด์ หรือ α-Chain ที่มีขนาดมวลโมเลกุลโดยประมาณ 300,000 ดาลตัน ซึ่งมีกรดอะมิโนเป็นหน่วยย่อย โดยเฉพาะโพรลีน ไฮดรอกซี โพรลีน และไกลซีน จึงมีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน (Amino acid profile) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารสกัดคอลลาเจน โดยพบปริมาณไกลซีนสูงถึงร้อยละ 30 และปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนร้อยละ 8-10 นอกจากนี้ กรดอะมิโนที่พบได้ในปริมาณสูง ได้แก่ อะลานีน (Alanine) กรดกลูทามิก (Glutamic acid) โพรลีน และ ไฮดรอกซีโพรลีน ส่วนกรดอะมิโนที่พบได้ในปริมาณต่ำ ได้แก่ ซิสเทอีน (Cysteine) ไทโรซีน (Tyrosine) เมไทโอนีน (Methionine) ไฮดรอกซีไลซีน (hydroxylysine) และฮีสทิดีน (Histidine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของฮีสทามีน (Histamine) ที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ได้ ถือเป็นข้อดีที่พบในปริมาณน้อย (Salvatore et al., 2020)

การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบโมเลกุลของสาร อาศัยหลักการการสั่น (Vibration) ของโมเลกุล โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงอินฟราเรดในช่วงเลขคลื่นประมาณ 12800 ถึง 10 cm^{-1} เมื่อสารอินทรีย์ดูดกลืนรังสีย่านอินฟราเรดกลางหรือเรียกว่าความถี่ ทำให้เกิดแทรนซิชันการสั่นพร้อมกับแทรนซิชันการหมุน เรียกเทคนิคนี้ว่า อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ซึ่งทรานซิชันการสั่นนี้จะทราบชนิดหมู่ทำหน้าที่ เช่น พันธะคู่ พันธะสาม หมู่คาร์บอนิล หมู่ไฮดรอกซิล

หมู่อะมิโน หรือภายในโครงสร้างของสาร (ศิรินิตย์ และ ปฐมาพร, 2561) สำหรับการศึกษาโมเลกุลคอลลาเจน (Collagen molecule) ด้วยเครื่อง FTIR พบว่ามีพีค Amide I ที่เลขคลื่นประมาณ 1650 cm^{-1} พีค Amide II ที่เลขคลื่นประมาณ 1560 cm^{-1} และพีค Amide III ที่เลขคลื่นประมาณ 1245 cm^{-1} ทั้งนี้ พบพีคใหม่ปรากฏที่เลขคลื่น 1083 cm^{-1} เฉพาะในเส้นใยคอลลาเจน (Collagen fibril) (Nashchekina et al., 2020) ส่วนการศึกษาคอลลาเจนชนิดที่ 1 3 4 5 และ 6 พบว่ามีพีคปรากฏที่เลขคลื่น 1035 cm^{-1} คือ ความถี่การสั่นของพันธะ C-O พีคที่เลขคลื่น 1079 cm^{-1} คือ ความถี่การสั่นของพันธะ C-O-C ในขณะที่พีคที่เลขคลื่น 1454 1403 1340 1282 1240 และ 1205 cm^{-1} คือ ความถี่การสั่นของพันธะ CH_2 CH_3 และ C-N ซึ่งพีค Amide I พบที่เลขคลื่น 1659 cm^{-1} ส่วนพีค Amide II พบที่เลขคลื่น 1555 cm^{-1} (Belbachir et al., 2009)



ภาพที่ 3 สเปกตรัมของ FTIR ในโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนชนิดที่ 1 3 4 5 และ 6 (Belbachir et al., 2009)

การศึกษาชนิดของคอลลาเจนหรือรูปแบบของโปรตีนโดยการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamine gel) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งจากโปรตีนรวม โดยแยกโปรตีนภายใต้สนามไฟฟ้าอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีโครงสร้างปฐมภูมิต่างกัน และหาปริมาณโปรตีนจากความเข้มของแถบโปรตีนที่จำเพาะเมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (กรรณาภรณ์ และคณะ, 2556)

1.4 การใช้ประโยชน์จากคอลลาเจน

คอลลาเจน เจลาติน รวมทั้ง คอลลาเจนไฮโดรไลเซต เช่น คอลลาเจนไตรเปปไทด์ และคอลลาเจนไดเปปไทด์ เป็นต้น สามารถใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม หรืออาหารเสริม เช่น สารสกัดคอลลาเจนชนิดที่ 1 ช่วยบำรุงผิว ลดริ้วรอย และชะลอวัย สารสกัดคอลลาเจนชนิดที่ 2 ช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงของข้อต่อบริเวณหัวเข่าในผู้สูงวัยได้ และการผลิตเป็นแผ่นฟิล์มเคลือบอาหารที่ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาคุณภาพของอาหารจากคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและความสามารถในการยับยั้งกระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน อีกทั้ง การประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง เช่น การใช้คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลซึ่งมีต้นทุนต่ำกว่า และให้ผลการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ

ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีเมลานินสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสวาย ผลิตเป็นเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่พบว่าอาสาสมัครมีความพึงพอใจโดยรวมอยู่ในระดับดีมาก และมีความต้องการซื้อผลิตภัณฑ์สูงเมื่อมีการวางจำหน่ายในท้องตลาด (พัชรพงษ์, 2561) นอกจากนี้ ยังสามารถประยุกต์ใช้เพื่อผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์ที่เกี่ยวกับการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และสมานแผลได้ เช่น แผ่นปิดแผล เป็นต้น รวมทั้ง การใช้คอลลาเจนช่วยเป็นตัวปลดปล่อยในระบบนำส่งยาทางเภสัชกรรม ซึ่งเป็นการเพิ่มระยะเวลาการออกฤทธิ์ ทำให้ผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องใช้ยาหรือรับประทานยาบ่อยๆ จึงช่วยลดความถี่ในการให้ยาได้ (ปวเรศวร์, 2563; Ahmed, Verma and Patel, 2020; Salvatore et al., 2020; Coppola et al., 2020)

2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การศึกษาคุณค่าทางอาหารจากเกล็ดปลา

ปวเรศวร์ และ สุภาพร (2564) ได้ศึกษาคอลลาเจนจากเกล็ดปลานวลจันทร์ทะเล (*Chanos chanos*) พบองคประกอบทางเคมีในเกล็ดปลานวลจันทร์ทะเล คือ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ร้อยละ 17.56±0.11 52.17±0.45 0.03±0.01 และ 30.24±0.10 กรัมของน้ำหนักแหง ตามลำดับ

พัชรพงษ์ (2561) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบว่ามีความชื้นร้อยละ 21.29±0.57 ของน้ำหนักแห้ง โปรตีนร้อยละ 48.27±0.15 ของน้ำหนักแห้ง ไขมันร้อยละ 0.037±0.015 ของน้ำหนักแห้ง และเถ้าร้อยละ 30.40±0.93 กรัมของน้ำหนักแห้ง

ฉลองขวัญ และคณะ (2551) ได้ศึกษาคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) พบองคประกอบทางเคมีในเกล็ดปลากะพงแดง คือ คารโบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเถา ร้อยละ 3.11 47.87 0.01 และ 49.01 กรัมของน้ำหนักแหง ตามลำดับ

Upasen and others (2019) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาทะเล Giant groupers (*Epinephelus lanceolatus*) พบว่ามีความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ร้อยละ 12.58 41.49 0.90 และ 1.89 ตามลำดับ ส่วนเกล็ดปลาน้ำจืด Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) พบว่ามีความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถา ร้อยละ 13.31 31.05 0.53 และ 10.20 ตามลำดับ

Ali, Benjakul and Kishimura (2017) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลา Golden carp (*Probarbus jullieni*) พบว่ามีความชื้นร้อยละ 16.24±0.18 โปรตีนร้อยละ 40.36±0.27 ไขมันร้อยละ 0.62±0.1 และเถ้าร้อยละ 42.16±0.21

2.2 การศึกษากรดไขมันจากเกล็ดปลา

การศึกษาปริมาณและชนิดของกรดไขมันจากเกล็ดปลาแซลมอน (*Salmo salar*) พบกรดไขมันร้อยละ 7 ของปริมาณไขมันทั้งหมด โดยพบคอเลสเตอรอลมากถึงร้อยละ 50 ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งพบกรดไขมันชนิดอิ่มตัว คือ กรดปาลมิติก (Palmitic acid; 16:0) กรดไขมันอิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acids; MUFAs) คือ กรดเนอร์โวนิก (Nervonic acid; 24:1n9) หรือโอเมกา 9 (Omega-9) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acids; PUFAs หรือ Highly unsaturated fatty acids, HUFAs) ได้แก่ กลุ่มโอเมกา 6 (Omega-6) คือ กรดอะราชิ

โดนิก (Arachidonic, ARA; 20:4n6) กลุ่มโอเมกา 3 (Omega-3) คือ กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (Eicosapentaenoic, EPA; 20:5n3) และกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (Docosahexaenoic, DHA; 22:6n3) อีกทั้ง ยังพบกลุ่มของกรดไขมันชนิด Furan-Ring (Furan fatty acids, FuFAs) (Grahl-Nielsen and Glover, 2010) ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ต้านจุลชีพ (Antimicrobial) และต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) (Alvarado et al., 2021)

2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา

Wang and others (2013) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์คอลลาเจนจากเกล็ดปลา Croceine Croaker คือ ACH-P1 ACH-P2 และ ACH-P3 ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical) ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.293, 0.240 และ 0.107 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical) ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.271, 0.675 และ 0.283 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical) ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.463, 0.099 และ 0.151 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical) ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.421, 0.309 และ 0.210 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อีกทั้งเปปไทด์คอลลาเจน ACH-P3 ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดกระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) ดังนั้น เปปไทด์คอลลาเจนทั้งสามจากเกล็ดปลา Croceine Croaker มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างๆ สามารถประยุกต์ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการรักษาโรคที่มาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) หรือลดภาวะการเปลี่ยนแปลงออกซิเดชันในระหว่างการเก็บรักษา

Sae-leaw and Benjakul (2018) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฮโดรไลซ์คอลลาเจนจากโอซีอีนเกล็ดปลาแซลมอน ด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (Diphenylpicryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) การวิเคราะหฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) และการวิเคราะหความสามารถในการรีดิวซเฟอรริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) พบว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 347 และ 219 ดาลตัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอสสูงที่สุดและมีความสามารถในการรีดิวซเฟอรริกของสารต้านอนุมูลอิสระรองลงไป ซึ่งได้สรุปว่าโอซีอีนเกล็ดปลาแซลมอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิคอัลตร้าซาวด์ (Ultrasound) ร้อยละ 70 แอมพลิจูด 750 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการให้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มผลผลิตและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไฮโดรไลซ์คอลลาเจน

2.4 การศึกษาชนิดของคอลลาเจนที่พบในเกล็ดปลา

Pang, Chang and Woo (2013) พบว่าการสกัดคอลลาเจนจากวัสดุเศษเหลือทิ้งในการแปรรูปปลาด้วยกรดอะซิติกนั้น ได้ปริมาณคอลลาเจนในส่วนหนังปลา เกล็ดปลา ก้างปลา และครีบปลา คิดเป็นร้อยละ 70.67 13.03 38.03 และ 40 ตามลำดับ โดยคอลลาเจนที่สกัดได้จากทั้งส่วนหนังปลา เกล็ดปลา ก้างปลา และครีบปลา เป็นชนิดที่ 1 ประกอบด้วยสาย β $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ซึ่งมีน้ำหนัก

โมเลกุลในส่วนของหนังปลา เกล็ดปลา และครีบปลา เท่ากับ 220.673 132.044 และ 120.065 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในขณะที่ น้ำหนักโมเลกุลของส่วนก้างปลาเท่ากับ 229.229 139.798 และ 124.72 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

มะลิวัลย์ และคณะ (2558) พบว่าการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระบอกดำ (*Liza subviridis*) โดยใช้กรดอะซิติกร่วมกับเปปซินร้อยละ 5 ให้ผลผลิตของคอลลาเจนมากที่สุดถึงร้อยละ 0.89 และคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นชนิดที่ 1 ประกอบด้วยสาย β α1 และ α2 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 233 122 และ 110 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

ปวเรศวร์ และ สุภาพร (2564) พบว่าการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานวลจันทร์ทะเล โดยใช้วิธีการกำจัดแคลเซียมที่แตกต่างกัน รวมทั้งการสกัดคอลลาเจนด้วยกรด และการสกัดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ได้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจน ASC-EDTA และ PSC-EDTA ร้อยละ 1.16 และ 1.32 ตามลำดับ โดยได้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนรวมร้อยละ 2.48 ในขณะที่ ปริมาณผลผลิตคอลลาเจน ASC-HCl และ PSC-HCl ร้อยละ 0.25 และ 0.66 ตามลำดับ โดยได้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนรวมร้อยละ 0.91 ซึ่งรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนเป็นชนิดที่ 1 ประกอบด้วยสายโซ่แอลฟา 2 สาย (α1 และ α2) สายโซ่เบต้า และสายโซ่แกมมา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเกล็ดปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*) เกล็ดปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) และเกล็ดปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) จากตลาดทรัพย์สิน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาจนกระทั่งตัวอย่างสะอาดไม่มีเศษเนื้อปะปน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นตัวอย่างถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นตัวอย่างสดเพื่อการวิเคราะห์หาความชื้น อีกส่วนทำให้แห้งแบบผึ่งแดดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเพื่อการวิเคราะห์กรดไขมัน และ Proximate content (โปรตีน ไขมัน และเถ้า)

ภาพที่ 4 เกล็ดปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*)

ภาพที่ 5 เกล็ดปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

ภาพที่ 6 เกล็ดปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*)

2. การวิเคราะห์คุณค่าอาหาร (Proximate analysis) (AOAC, 2000)

สุ่มตัวอย่างเกล็ดปลาแต่ละชนิดที่ผ่านการตากแห้ง มาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วย Air oven method ปริมาณเถ้าด้วย Muffle furnace ปริมาณโปรตีนรวมด้วย Kjeldahl method และปริมาณไขมันรวมด้วยเทคนิค Soxhlet extraction ดังนี้

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

1. อบถ้วยกระเบื้อง (Crucible) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator) นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างใส่ลงในถ้วยกระเบื้องที่อบแห้ง และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (A)

3. นำถ้วยกระเบื้องที่บรรจุตัวอย่างเข้าอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (B)

4. นำไปชั่งน้ำหนัก จนได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตร

เปอร์เซ็นต์ความชื้น = น้ำหนักที่หายไป (A-B) (กรัม) x 100 / น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

<u>การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า</u>

เถ้า (Ash) หมายถึง ปริมาณสารอนินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร หลังจากที่เผาสารอินทรีย์หมดแล้ว ในการหามักจะใช้ความร้อนเผาสารอินทรีย์ ดังนั้นค่าเถ้าที่ได้จึงไม่จำเป็นต้องเท่ากับปริมาณสารเกลือแร่ทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารตอนแรก สารอนินทรีย์หรือเกลือแร่บางส่วนจะสูญเสียไปโดยการระเหยเพราะความร้อนที่ใช้ในการเผานั่นเอง ค่าเถ้าที่ได้จึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของอาหารนั้นๆ

วิธีวิเคราะห์

1. อบถ้วยกระเบื้องในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (A) ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

2. นำตัวอย่าง 0.1 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง

3. นำไปเผาในเตาเผา (Muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จนตัวอย่างกลายเป็นเถ้า แล้วทิ้งไว้ให้เย็นโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักตัวอย่างซ้ำอีกครั้ง (B)

4. สารที่เหลืออยู่ในถ้วย คือ ส่วนของสารอนินทรีย์หรือเถ้า ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ นำมาคำนวณหาค่าจากสูตร

% เถ้า = (B-A) x 100 / น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การวิเคราะห์โปรตีนรวม (Kjeldahl method)

การวิเคราะห์หาโปรตีนรวมโดยการหาปริมาณไนโตรเจนด้วยเครื่อง KJELTEC SYSTEM นำตัวอย่าง 0.2 กรัมแห้ง ผสมกับตัวเร่งปฏิกิริยาคือ 3.5 กรัม K_2SO_4 และ 0.4 กรัม $CuSO_4.5H_2O$

จากนั้น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นจำนวน 12 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย และนำไปย่อยที่อุณหภูมิ 430 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายใส (ประมาณ 45 นาที) ส่วนของอินทรียวัตถุจะสลายตัวไป สารประกอบไนโตรเจนทั้งที่เป็นส่วนของโปรตีนแท้และไม่ใช่โปรตีน (ยกเว้นที่อยู่ในรูปของไนเทรตและไนไทรต์) จะถูกเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 50 มิลลิลิตร จากนั้น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ลงไป นำไปกลั่น แอมโมเนียจะถูกไล่ออกมา ทำการจับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ด้วยกรดบอริกที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 25 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ แล้วนำไปไตเตรทกับกรดเกลือ (HCl) มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีส้มแดง นำไปคำนวณหาความเข้มข้นของไนโตรเจน เนื่องจากโปรตีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยเฉลี่ย 16 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงคำนวณหาค่าโปรตีนรวมได้โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\% \text{ โปรตีนรวม (CP)} = \% \text{ ไนโตรเจน} \times 6.25$$

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีนจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = \frac{(VA - VB) \times N \times 0.014 \times DF \times 100 \times CF}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

VA = ปริมาณของ HCI ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

VB = ปริมาณของ HCI ที่ใช้ในการไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)

N = นอร์มอลของ HCI

DF = Dilution Factor

CF = Conversion Factor

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (Soxhlet Extraction)

การวิเคราะห์หาไขมันในตัวอย่างทำได้โดยใช้ตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether) เป็นตัวสกัด ด้วยเครื่องมือที่เรียกว่าซอกเทค (Soxtech) Foss Soxtoc 2043 สารที่ถูกสกัดได้แบ่งเป็น 2 พวกคือ สารพวกไขมัน คือ กลีเซอไรด์ของกรดไขมัน กรดไขมันอิสระ สเตอรอล (Sterol) เลซิติน (Lecithin) และไขมันที่ระเหยได้ และสารพวกที่ไม่ใช่ไขมัน แต่ตัวทำละลายสามารถสกัดออกมาได้ด้วย คือ เม็ดสีต่างๆ เรซิน (Resin) สารประกอบพวกอัลคาไลน์ และพวกวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ A D E และ K เนื่องจากสารที่ไม่ใช่ไขมันนี้มีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับสารพวกไขมัน ดังนั้น สารพวกที่ไม่ใช่ไขมันจึงไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน จากการที่สารที่ถูกสกัดมีทั้งพวกที่เป็นไขมันและไม่ใช่ไขมัน จึงเรียกสารทั้งสองพวกนี้ว่า Crude fat

การสกัดไขมันในตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัมแห้ง ใส่บนกระดาษกรอง

2. นำตัวอย่างที่ห่ออยู่ในกระดาษกรอง ใส่ลงในทิมเบิล

3. นำทิมเบิลใส่ใน Extraction unit of soxhlet ซึ่งเชื่อมต่อกับ 1046 Service unit

4. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงใน Extraction cup ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 50 มิลลิลิตร ประกอบเครื่อง Soxhlet เข้าด้วยกัน

5. ให้ความร้อน ทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างนานประมาณ 1–2 ชั่วโมง

6. กลั่นเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมัน นำ Extraction cup และไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนัก

น้ำหนักไขมัน = (น้ำหนักไขมัน + น้ำหนัก Cup) - น้ำหนัก Cup เปล่า

ปริมาณไขมันทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก) = น้ำหนักไขมัน x 100 / น้ำหนักตัวอย่าง (แห้ง)

คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (Nitrogen free extract, NFE)

ทำการคำนวณหาคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย = 100 - ความชื้น - ไขมัน - โปรตีน - เยื่อใย

3. การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

ขั้นตอนการวิเคราะห์กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการสกัดไขมันในตัวอย่าง (Folch et al., 1957) และขั้นตอนการทำทรานเอสเทอริฟิเคชันด้วยกรด (Acid - catalysed transesterification) หลังจากนั้น นำไปวัดปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (ดัดแปลงวิธีของ Christie, 2003)

การสกัดไขมันในตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผสมสารต้านออกซิเดชัน (Butylated hydroxytoluene; BHT) 0.01 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปสกัดด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิคเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนใส่กรวยแยก และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้น นำสารละลายที่ได้นำมารวมกันในกรวยแยก

2. เติมสารละลาย 0.88 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ปริมาณ 1 ใน 4 ของปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการสกัด ปิดฝากรวยแยก เขย่าประมาณ 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น

3. ชั่งน้ำหนักฟลาสก์ก้นกลมที่ได้ ทำความสะอาดด้วยอะซิโตน และอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายชั้นล่างผ่านกรวยแก้วที่บรรจุโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส เพื่อดูดความชื้น ผ่านลงในฟลาสก์ก้นกลม

4. นำสารละลายในฟลาสก์ก้นกลมไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศ

5. นำฟลาสก์ก้นกลมที่มีไขมันทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน

6. ชั่งน้ำหนักฟลาสก์และสารสกัดไขมันด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง เพื่อหาน้ำหนักของสาร สารสกัดไขมันอย่างหยาบ (Crude fat)

7. ละลายสารสกัดไขมันด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1) ที่ผสม BHT 0.01 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้น 1000 พีพีเอ็ม เพื่อนำไปทรานเอสเทอริฟิเคชันต่อไป

การทรานเอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

1. ปิเปตสารสกัดไขมัน ความเข้มข้น 1000 พีพีเอ็ม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ชนิดฝาเกลียว จากนั้น เติมสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ ของกรดซัลฟูริกในเมทานอล 10 มิลลิลิตร นำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2. นำสารละลายออกจากตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายใส่กรวยแยก ชะสารที่ตกค้างในหลอดทดลองด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเก็บรวมกันในกรวยแยก

3. เติมเฮกเซน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก เขย่า 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น จากนั้น เก็บสารละลายชั้นบนไว้ (เฮกเซน) และถ่ายสารละลายชั้นล่างลงในหลอดทดลองเดิม เพื่อนำมาสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น แล้วใช้หลอดดูดสารดูดสารละลายชั้นบนใส่รวมกับสารละลายในกรวยแยกอันเดิม

4. เติมสารละลายโพแทสเซียมไบคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก เขย่าเล็กน้อย 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น แล้วเก็บสารละลายชั้นบน

6. เทสารละลายที่เก็บไว้ในกรวยแยกลงในฟลาสก์ก้นกลมผ่านกรวยแก้วที่บรรจุโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส

7. นำฟลาสก์ก้นกลมไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบสุญญากาศ และเป่าแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้น ละลายด้วยเฮกเซน (n-Hexane) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนถ่ายลงในขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปฉีดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

8. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ และชนิดของอุปกรณ์ตรวจวัดเป็น Flame ionizertion detecter (FID) คอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์ชนิด HP-INNOWax ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร และเคลือบด้วย Polyethylene glycol หนา 0.25 ไมโครเมตร ปริมาตรที่ฉีด 2 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้ ฉีดด้วยระบบ Split ในอัตราการ Spit เท่ากับ 10:1 อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม (แก๊สพา) 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ ณ จุดฉีดสารเท่ากับ 240 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่อุปกรณ์ตรวจวัด (ดีเทคเตอร์) เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส โปรแกรมอุณหภูมิวิเคราะห์เริ่มต้นที่ 120 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 0.50 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 170 องศาเซลเซียส ใน

อัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 190 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 3 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ 15 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 210 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 2 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ 15 นาที รวมระยะเวลาทั้งหมดในการวิเคราะห์ 54 นาที

การแยกและการตรวจวัด

การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเกล็ดปลาโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมัน 37 ชนิด (Supelco 37-Component FAME MixSupelco, USA) สำหรับการวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันในตัวอย่าง ใช้การเปรียบเทียบเวลาที่พีคของสารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์เทียบกับเวลาของสารมาตรฐานซึ่งทราบแล้วว่าแต่ละพีคเป็นสารมาตรฐานชนิดใด ส่วนการหาปริมาณของกรดไขมัน คำนวณปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับปริมาณกรดไขมันทั้งหมดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%TFA) ซึ่งทำโดยใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างกับพื้นที่ทั้งหมด

สารมาตรฐาน Supelco 37-Component FAME Mix Supelco, USA

1. Butyric acid (C4:0)
2. Caproic acid (C6:0)
3. Caprylic acid (C8:0)
4. Capric acid (C10:0)
5. Undecanoic acid (C11:0)
6. Lauric acid (C12:0)
7. Tridecanoic acid (C13:0)
8. Myristic acid (C14:0)
9. Myristoleic acid (C14:1)
10. Pentadecanoic acid (C15:0)
11. cis-10-Pentadecenoic acid (C15:1)
12. Palmitic acid (C16:0)
13. Palmitoleic acid (C16:1)
14. Heptadecanoic acid (C17:0)
15. cis-10-Heptadecenoic acid (C17:1)
16. Stearic acid (C18:0)
17. Oleic acid (C18:1n9c)
18. Elaidic acid (C18:1n9t)
19. Linoleic acid (C18:2n6c)
20. Linolelaidic acid (C18:2n6t)
21. γ-Linolenic acid (C18:3n6)
22. α-Linolenic acid (C18:3n3)
23. Arachidic acid (C20:0)
24. cis-11-Eicosenoic acid (C20:1n9)
25. cis-11, 14-Eicosadienoic acid (C20:2)
26.cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid (C20:3n6)
27. cis-11, 14, 17-Eicosatrienoic acid (C20:3n3)
28. Arachidonic acid (C20:4n6)
29. cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid (C20:5n3)
30. Heneicosanoic acid (C21:0)
31. Behenic acid (C22:0)
32. Erucic acid (C22:1n9)
33. cis-13, 16-Docosadienoic acid (C22:2)
34. cis-4,7,10, 13, 16, 19-Docosahexaenoic acid (C22:6n3)
35. Tricosanoic acid (C23:0)
36. Lignoceric acid (C24:0)
37. Nervonic acid (C24:1n9)

คำนวณ %กรดไขมัน

%กรดไขมัน = 100 x พื้นที่ใต้พีคของกรดไขมัน / A

A = พื้นที่ใต้พีคกรดไขมันทั้งหมด – (พื้นที่ใต้พีคเฮกเซน + พื้นที่ใต้พีค BHT)

4. การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล

คอลลาเจนที่ละลายได้ในกรดอ่อนจากเกล็ดปลาทะเลด้วยสภาวะต่างๆ เพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนมากที่สุด จำนวน 5 วิธี มีดังนี้

4.1 การสกัดคอลลาเจนด้วย 0.5 โมลาร์ กรดอะซิติก ร่วมกับเอนไซม์ปาเปน (Papain)

การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอ่อนร่วมกับเอนไซม์ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากทนงศักดิ์, 2556 และมะลิวัลย์ และคณะ, 2558 โดยชั่งน้ำหนักเกล็ดปลา 20 กรัม เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.2 นอร์มอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:10 เพื่อกำจัดแคลเซียมออกจากเกล็ดปลา บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และกวนตลอดเวลา จากนั้นล้างเกล็ดปลาจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 แล้วจึงนำไปผ่านขั้นตอนการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและเม็ดสีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ในอัตราส่วน 1:10 โดยกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเปลี่ยนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทุก 2 ชั่วโมง จนกระทั่งครบ 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างเกล็ดปลาด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 จึงนำไปสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกร่วมกับเอนไซม์ปาเปน เพียงรอบเดียวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยแช่เกล็ดปลาในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (พีเอช 2.0) ด้วยอัตราส่วนเกล็ดปลาต่อกรดอะซิติกเท่ากับ 1:5 และเติมเอนไซม์ปาเปนด้วยความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องอัลตร้าโซนิค (Ultrasonic Bath หรือ Sonicator) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บ่มนาน 42 ชั่วโมง จากนั้นกรองอย่างหยาบผ่านตะแกรงเพื่อแยกเกล็ดปลาออกและนำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย 0.5 โมลาร์ กรดอะซิติก โดยไม่เติมเอนไซม์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และกวนตลอดเวลา นำสารสกัดคอลลาเจนที่ได้ไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเหยือกแข็ง (Freeze dry) จากนั้นชั่งน้ำหนักและคำนวณหาปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนที่สกัดได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณผลผลิตของคอลลาเจน (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนหลังจากการทำแห้ง (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของเกล็ดปลาเริ่มต้น (กรัม)}}$$

4.2 การสกัดคอลลาเจนด้วย 0.2 โมลาร์ กรดอะซิติก บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

ชั่งน้ำหนักเกล็ดปลา 20 กรัม เติมสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (พีเอช 5.0) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:10 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องอัลตร้าโซนิค เป็นเวลา 30 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่ 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดซ้ำและเก็บสารสกัดคอลลาเจนโดยนับเวลาต่อเนื่องเป็น 24 ชั่วโมง ถัดไปทำการสกัดซ้ำและเก็บสารสกัดคอลลาเจนโดยนับเวลาต่อเนื่องเป็น 48 ชั่วโมง ต่อไปทำการสกัดซ้ำและเก็บสารสกัดคอลลาเจนโดยนับเวลาต่อเนื่องเป็น 72 ชั่วโมง สุดท้ายทำการสกัดซ้ำและเก็บสารสกัดคอลลาเจนโดยนับ

เวลาต่อเนื่องเป็น 96 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ ทำการวิเคราะห์หาโปรตีนรวมของสารสกัดคอลลาเจนที่เวลา 16, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ด้วย Kjeldahl method

4.3 การสกัดคอลลาเจนด้วย 0.2 โมลาร์ กรดซิตริก (Citric acid) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่งน้ำหนักเกล็ดปลา 20 กรัม เติมสารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (พีเอช 2.0) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:20 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กวนตลอดเวลา เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น ทำการสกัดซ้ำในอัตราส่วน 1:10 ที่สภาวะเดิมและเก็บสารสกัดคอลลาเจนโดยนับเวลาต่อเนื่องเป็น 12 ชั่วโมง สุดท้ายทำการสกัดซ้ำในอัตราส่วน 1:10 ที่สภาวะเดิมและเก็บสารสกัดคอลลาเจนโดยนับเวลาต่อเนื่องเป็น 24 ชั่วโมง

4.4 การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่งน้ำหนักเกล็ดปลา 20 กรัม เติมสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 และ 0.2 โมลาร์ (พีเอช 3.0) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:20 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กวนตลอดเวลา เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น ทำการสกัดซ้ำในอัตราส่วน 1:10 ที่สภาวะเดิมและเก็บสารสกัดคอลลาเจนโดยนับเวลาต่อเนื่องเป็น 12 ชั่วโมง สุดท้ายทำการสกัดซ้ำในอัตราส่วน 1:10 ที่สภาวะเดิมและเก็บสารสกัดคอลลาเจนโดยนับเวลาต่อเนื่องเป็น 24 ชั่วโมง

4.5 การสกัดคอลลาเจนด้วย 0.2 โมลาร์ กรดอะซิติก ร่วมกับคลื่นไมโครเวฟ

ชั่งน้ำหนักเกล็ดปลา 20 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:10 เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและเม็ดสี กวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างเกล็ดปลาด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 จึงทำการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:10 โดยนำเข้าเครื่องไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 850 วัตต์ เป็นเวลา 4 นาที กรองผ่านตะแกรงและเก็บสารสกัดคอลลาเจนอย่างหยาบที่ได้

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจนอย่างหยาบด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS

<u>การเตรียมตัวอย่าง (Freeze-dried sample)</u>

ทำ Stock solution โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 10 มิลลิกรัม (0.0100 กรัม) ละลายด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้น ทำการเจือจางหนึ่งเท่า โดยการดูด Stock solution ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 500 ไมโครลิตร ของเมทานอล ในหลอดไมโครทิวป์ (Microtube หรือ Microcentrifuge tube หรือ Eppendorf tube) จะได้สารละลายความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงทำการเจือจางลำดับส่วน จำนวนทั้งหมด 12 หลอดไมโครทิวป์

การเตรียมสารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid) หรืออนุพันธ์ของวิตามินอี (Trolox) ที่ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (Stock solution)

ชั่งสารมาตรฐานวิตามินซี หรือ อนุพันธ์ของวิตามินอี 0.0010 กรัม ละลายด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร

การเตรียม 0.2 มิลลิโมลาร์ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

ชั่งสาร DPPH 0.0020 กรัม ละลายด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร

การเตรียม ABTS radical Stock Solution

การเตรียม 7 มิลลิโมลาร์ ABTS

ชั่งสาร ABTS 0.0192 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร

การเตรียม 140 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$)

ชั่งโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.0378 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร

5.1 วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity (Fenglin et al., 2004)

อนุมูลของสาร DPPH มีสีม่วงและอยู่ในรูปอนุมูลไนโตรเจนที่มีความคงตัวมาก ไม่ต้องผ่านทำปฏิกิริยาให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณี $ABTS^{\bullet+}$ โดยสารต้านออกซิเดชันจะให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH ช่วยให้สารนี้เสถียร ส่งผลให้สารละลายเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง เมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515 หรือ 517 นาโนเมตร (ปฏิวิทย์, 2555)

นำสารสกัดคอลลาเจนอย่างหยาบที่ผ่านการเจือจางลำดับส่วนทั้ง 12 ความเข้มข้น หยอดลงใน Microtiter plate 96-well ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยอดจำนวนสามซ้ำในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นเติมสารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งมีเมทานอลปริมาตร 200 ไมโครลิตร เป็น Blank และมีเมทานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็น Negative control นำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microplate reader (Multiskan Go, Thermo; Finland) บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (% inhibition) ของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังสมการ จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (คือค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50%) เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็น Positive control ได้แก่ วิตามินซี และอนุพันธ์ของวิตามินอี

5.2 วิธี 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenz thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) free radical cation decolorization activity (Yang et al., 2011)

ใช้หลักการเหมือนกับการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH แต่ในกรณี $ABTS^{\bullet+}$ เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุเป็นบวก สารละลายจะมีสีเขียวเข้มและมีค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นสูงสุดหลายค่าได้แก่ 415, 645, 734 และ 815 นาโนเมตร โดยทั่วไปนิยมใช้ความยาวคลื่นที่ 415 และ 743 นาโนเมตร เพื่อติดตามปฏิกิริยา ซึ่งการเตรียมอนุมูลอิสระของ ABTS เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่าในกรณีของ DPPH นั่นคือ ต้องนำเอา ABTS ไปบ่มกับ Potassium persulfate ด้วยอัตราส่วน 1:0.5 (Stoichiometry ratio) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้ได้อนุมูลอิสระที่เป็นประจุบวกของ $ABTS^{\bullet+}$ ก่อนนำไปใช้ทดสอบปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระต่อไป (กิตติพัฒน์ และ ปานทิพย์, 2560)

<u>การเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS</u>

ทำการผสมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 35.5 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้ stock ABTS radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) ทั้งนี้ ก่อนเริ่มทำการทดสอบให้เจือจาง stock $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยเมทานอล เพื่อให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.70±0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

<u>การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS</u>

นำสารสกัดคอลลาเจนอย่างหยาบที่ผ่านการเจือจางลำดับส่วนทั้ง 12 ความเข้มข้น หยอดลงใน Microtiter plate 96-well ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยอดจำนวนสามซ้ำในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นเติมสารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งมีเมทานอลปริมาตร 150 ไมโครลิตร เป็น Blank และมีเมทานอลปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็น Negative control นำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} เทียบกับวิตามินซีและอนุพันธ์ของวิตามินอี ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

6. การวิเคราะห์คุณสมบัติของคอลลาเจน

6.1 การดูดกลืนแสงยูวี (UV absorption)

นำตัวอย่างสารสกัดหยาบคอลลาเจนบรรจุใส่ในหลอดไมโครทิวป์ ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย (Minicentrifuge) ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 230 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

6.2 การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจน

ศึกษาโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนของเกล็ดปลาเก๋า เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาช่อนทะเล ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

ภาพที่ 7 เครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

6.3 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดอะมิโน (Amino acid profile)

นำสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาเก๋า เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาช่อนทะเล ที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (พีเอช 5.0) ในอัตราส่วน 1:10 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องอัลตร้าโซนิค เป็นเวลา 30 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่ 16 ชั่วโมง (ข้อ 4.2) ส่งวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ห้องปฏิบัติกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาฉะเชิงเทรา ด้วยวิธีทดสอบ In-house method based on Journal Association of Official Analytical Chemists Vol.72 No.6 (1989) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC)

6.4 การศึกษาชนิดคอลลาเจนโดยใช้เทคนิค SDS–PAGE (Laemmli, 1970)

เตรียมตัวอย่างคอลลาเจนที่สกัดได้ผสมกับบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 0.6 โมลาร์ Tris-HCl ค่าพีเอชเท่ากับ 6.8 2 เปอร์เซ็นต์ SDS 10 เปอร์เซ็นต์ Glycerol 0.025 เปอร์เซ็นต์ Bromophenol blue และ 0.1 มิลลิโมลาร์ DTT ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแยกรูปแบบโปรตีนโดยใช้โพลีอะคลิลาไมด์เจลที่มี 4 เปอร์เซ็นต์ Stacking gel และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ Separating gel ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 220 โวลต์ และกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ (552BR Mini-protean Tetra System, Bio-RAD) นาน 60 นาที

แล้วนำเจลแช่ในสารละลายตรึงที่ประกอบด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก และ 16 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และแช่ในน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้งๆละ 5 นาที จึงย้อมสีเจลด้วย Protein staining solution (PageBlue, Frementas Life sciences, USA)

ผลการวิจัย

1. คุณค่าทางอาหารของเกล็ดปลาทะเล

องค์ประกอบหลักของเกล็ดปลาที่ตรวจพบ คือ โปรตีนและเถ้า การศึกษาคุณค่าทางอาหารพบว่าเกล็ดปลาเก๋า เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาช่อนทะเล มีโปรตีนรวมในปริมาณร้อยละ 48.13±0.62 55.05±0.21 และ 51.95±0.21 กรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ปริมาณเถ้าหรือแร่ธาตุร้อยละ 25.92±1.41 33.72±0.81 และ 37.97±1.03 กรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และปริมาณไขมันรวมร้อยละ 0.07±0.02 0.07±0.01 และ 0.05±0.01 กรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณค่าทางอาหารของเกล็ดปลาทะเล คิดเป็นร้อยละกรัมของน้ำหนักแห้ง (Mean±SD)

ตัวอย่าง	ความชื้น	เถ้า	โปรตีน	ไขมัน
เกล็ดปลาเก๋า	7.63±0.02	25.92±1.41	48.13±0.62	0.07±0.02
เกล็ดปลากะพงขาว	8.55±0.03	33.72±0.81	55.05±0.21	0.07±0.01
เกล็ดปลาช่อนทะเล	11.07±0.40	37.97±1.03	51.95±0.21	0.05±0.01

2. ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในเกล็ดปลาทะเล

จากการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างเกล็ดปลาทะเลทั้ง 3 ชนิด โดยการสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล อัตราส่วน 2:1 ตามวิธีของ Folch, Lees and Sloane-Stanlet (1957) และตามวิธีของ Christie (2003) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมัน Supelco 37-Component FAME พบปริมาณกรดไขมันโดยรวมในปริมาณ 48.41-53.20 %TFA คุณลักษณะกรดไขมันที่พบเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (Saturated fatty acids; SFAs) ในปริมาณ 39.59-48.91 %TFA ชนิดกรดไขมันที่ตรวจพบปริมาณสูงได้แก่ กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, 16:0) ปริมาณ 14.57-17.82 %TFA, กรดเฮปตาเดคาโนอิก (Heptadecanoic acid, 17:0) ปริมาณ 7.95-21.49 %TFA และกรดสเตียริก (Stearic acid, 18:0) ปริมาณ 6.45-8.30 %TFA ส่วนกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid ; PUFAs) พบเฉพาะในตัวอย่างเกล็ดปลากะพงเท่านั้น มีปริมาณ 4.62 %TFA ซึ่งชนิดของกรดไขมันที่ตรวจพบ ได้แก่ กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, 18:2n6c), กรดไลโนอิไลดิก (Linolelaidic acid, 18:2n6), กรดแกมมาไลโนเลนิก (**γ**-Linolenic acid, 18:3n6) และกรดอัลฟาไลโนเลนิก (**α**-Linolenic acid, 18:3n3) โดยพบในปริมาณที่ต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างเกล็ดปลาทะเล mean±SD (%TFA) dry wt.

ชนิดกรดไขมัน	เกล็ดปลากะพงขาว	เกล็ดปลาเก๋า	เกล็ดปลาช่อนทะเล
C6:0	nd	nd	nd
C8:0	nd	nd	nd
C12:0	0.56±0.10	nd	nd
C13:0	nd	nd	nd
C14:0	1.72 ±0.41	2.69±0.76	nd
C15:0	4.67±1.33	nd	nd
C16:0	14.57±1.25	16.10±0.55	17.82±0.23
C17:0	7.95±0.06	18.23±0.43	21.49±1.57
C18:0	8.18±1.67	8.30±1.09	6.45±0.67
C20:0	0.65±0.19	nd	nd
C21:0	nd	nd	nd
C22:0	0.75±0.11	nd	1.97±0.68
C23:0	nd	nd	nd
C24:0	0.52±0.23	nd	1.17±0.26
SFAs	39.59	45.31	48.91
C14:1	0.34±0.08	nd	nd
C15:1	nd	nd	nd
C16:1	0.75±0.05	1.30±0.70	nd
C17:1	nd	nd	nd
C18:1n9 (c+t)	5.40±0.01	1.80±0.01	nd
C20:1n9	nd	nd	nd
C22:1n9	2.51±0.34	nd	nd
C24:1n9	nd	nd	nd
MUFAs	8.99	3.10	nd
C18:2n6 c	0.28±0.05	nd	nd
C18:2n6 t	1.85±0.92	nd	nd
C18:3n6	0.24±0.00	nd	nd
C18:3n3	0.60±0.40	nd	nd
C20:2	1.64±0.04	nd	nd
C20:3n6	nd	nd	1.09±0.38
C20:4n6	nd	nd	nd

ชนิดกรดไขมัน	เกล็ดปลากะพงขาว	เกล็ดปลาเก๋า	เกล็ดปลาช่อนทะเล
C20:3n3	nd	nd	nd
C20:5n3	nd	nd	nd
C22:2	nd	nd	nd
C22:6n3	nd	nd	nd
PUFAs	4.62	nd	1.09
SUM	53.20	48.41	50.00

หมายเหตุ Nd = not detect

3. การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล

ในการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล พบว่ามีปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 4 ต่อน้ำหนักแห้ง สำหรับการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาเก๋า เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาช่อนทะเล ด้วย 0.2 โมลาร์ กรดอะซิติก โดยใช้เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 16 ชั่วโมง สารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาเก๋ามีปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 1.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ % โปรตีนรวม 0.88 สารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวมีปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 2.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ % โปรตีนรวม 2.44 และสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเลมีปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 3.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ % โปรตีนรวม 2.44 ดังแสดงในตารางที่ 5 ดังนั้น จึงเลือกสารสกัดคอลลาเจนที่ละลายได้ในกรดอ่อนจากเกล็ดปลาทะเลทั้งสามชนิดที่เวลา 16 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดอะมิโน

ตารางที่ 5 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดคอลลาเจนที่ละลายได้ในกรดอ่อนจากเกล็ดปลาทะเล ภายใต้สภาวะการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

สารสกัดคอลลาเจน	การตรวจวิเคราะห์	16 ชม.	24 ชม.	40 ชม.	48 ชม.	64 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
เกล็ดปลาเก๋า	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.43	0.47	0.95	1.22	0.65	0.91	0.89
	% ไนโตรเจน	0.14	0.04	-	0.18	-	0.13	0.11
	% โปรตีนรวม	0.88	0.25	-	1.13	-	0.81	0.69
เกล็ดปลากะพงขาว	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	2.68	0.83	0.85	0.70	0.46	0.63	0.54
	% ไนโตรเจน	0.39	0.07	-	0.10	-	0.08	0.06
	% โปรตีนรวม	2.44	0.44	-	0.63	-	0.50	0.38
เกล็ดปลาช่อนทะเล	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	3.06	1.70	4.09	2.43	1.39	2.14	0.94
	% ไนโตรเจน	0.39	0.08	-	0.30	-	0.17	0.09
	% โปรตีนรวม	2.44	0.50	-	1.88	-	1.06	0.56

4. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS

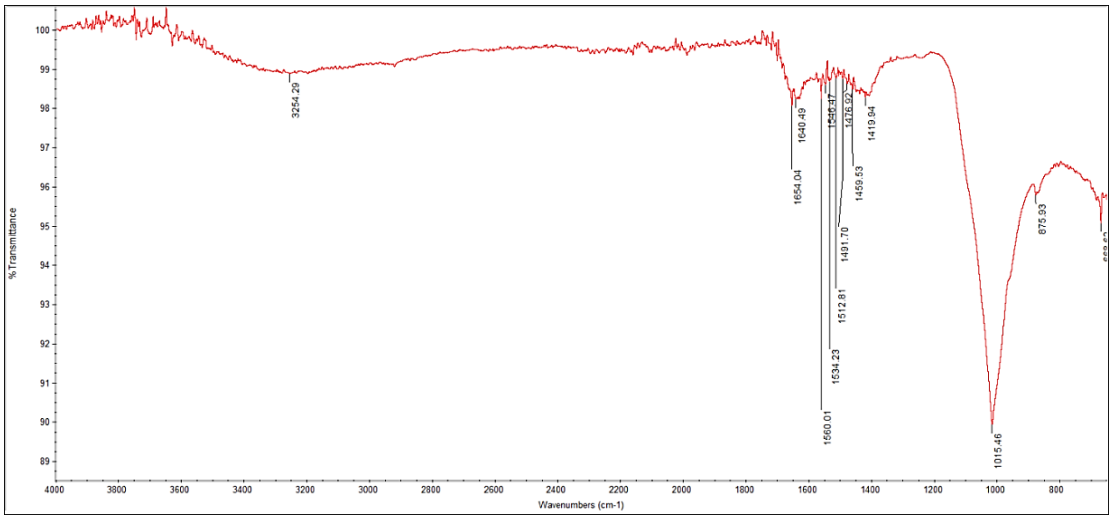
เนื่องด้วยปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบในสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลทั้งสามชนิด พบว่าสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาเก๋ามี % ไนโตรเจน และ % โปรตีนรวม ค่าต่ำมาก ในขณะที่สารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวและเกล็ดปลาช่อนทะเล มี % ไนโตรเจน และ % โปรตีนรวม ค่าสูง ดังนั้น จึงทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวและสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเล ที่ผ่านการสกัดด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค และการสกัดด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นไมโครเวฟ เพื่อทำการทดสอบ โดยเตรียมจากตัวอย่างที่ผ่าน Freeze-drying แล้วทำเป็น Stock solution ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นไมโครเวฟ ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ดีกว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค ซึ่งสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 12.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 14.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ สารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดี โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ ABTS ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวและเกล็ดปลาช่อนทะเล

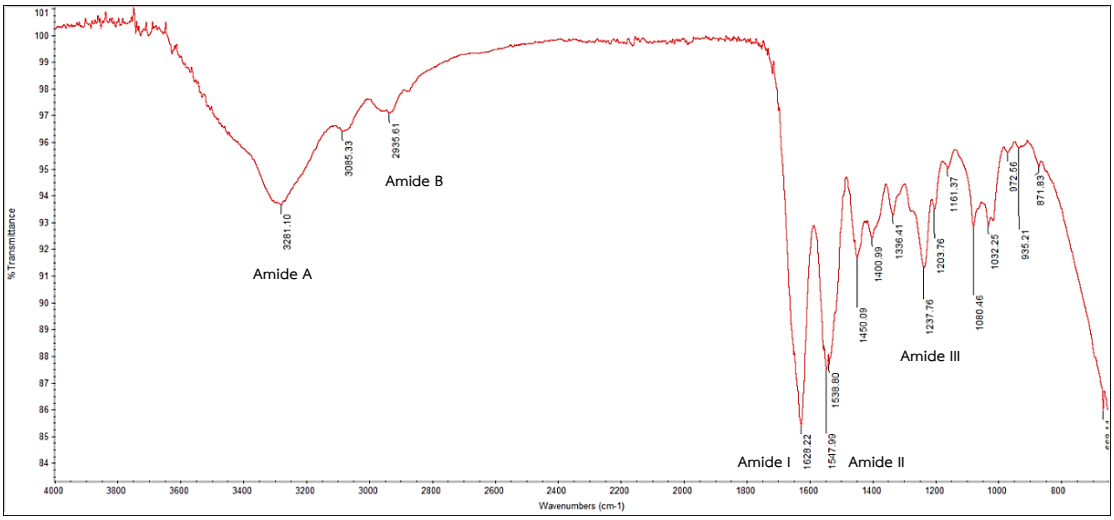
ตัวอย่าง	IC_{50} (mg protein/ml)	
	DPPH	ABTS
สารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวด้วยกรดอะซิติกร่วมกับการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค	14.31	6.22
สารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเลด้วยกรดอะซิติกร่วมกับการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค	21.19	3.11
สารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวด้วยกรดอะซิติกร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ	12.75	0.78
สารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเลด้วยกรดอะซิติกร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ	20.09	0.38
สารมาตรฐานวิตามินซี	0.0126	0.0036
สารมาตรฐานอนุพันธ์ของวิตามินอี	0.0134	0.0029

5. การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลด้วยเทคนิค FTIR

จากการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของเกล็ดปลากะพงขาว ก่อนและหลังทำการสกัดคอลลาเจน ดังภาพที่ 8 และ 9 ตรวจพบพีคที่เป็นคุณลักษณะเฉพาะของคอลลาเจน 5 พีค ได้แก่ amide A, amide B, amide I, amide II และ amide III ในตัวอย่างเกล็ดปลากะพงขาวหลังสกัดคอลลาเจนที่ละลายได้ในกรดอ่อน โดยพีค amide A พบที่เลขคลื่น 3281.10 cm^{-1} พีค amide B พบที่เลขคลื่น 2935.61 cm^{-1} พีค amide I พบที่เลขคลื่น 1628.22 cm^{-1} พีค amide II พบที่เลขคลื่น 1547.99 cm^{-1} และพีค amide III พบที่เลขคลื่น 1237.76 cm^{-1}



ภาพที่ 8 โครงสร้างโมเลกุลของเกล็ดปลากะพงขาว ก่อนทำการสกัดคอลลาเจน



ภาพที่ 9 โครงสร้างโมเลกุลของเกล็ดปลากะพงขาว หลังทำการสกัดคอลลาเจน

6. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล

นำสารสกัดคอลลาเจนหยาบจากเกล็ดปลาเก๋า เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาช่อนทะเล ที่สกัดด้วย 0.2 โมลาร์ กรดอะซิติก โดยใช้เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที บ่มที่

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดอะมิโน โดยมีกรดอะมิโนมาตรฐานจำนวน 23 ชนิด ตรวจพบกรดอะมิโนในตัวอย่างจำนวน 17 ชนิด เป็นกรดอะมิโนชนิดจำเป็น 9 ชนิด กรดอะมิโนชนิดไม่จำเป็นจำนวน 7 ชนิด และ Hydroxyproline โดยกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูง 4 อันดับแรก ได้แก่ Glycine (Gly), Proline (Pro), Alanine (Ala) และ Glutamic acid (Glu) ซึ่งเป็นกลุ่มของกรดอะมิโนชนิดไม่จำเป็น พบมากที่สุดในตัวอย่างสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเล เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาเก๋า ตามลำดับ ในขณะที่ ไม่พบกรดอะมิโน Cystine (CySS), Tryptophan (Try), Tyrosine (Tyr), Asparagine (Asp), Cysteine (Cys) และ Hydroxylysine ในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 7

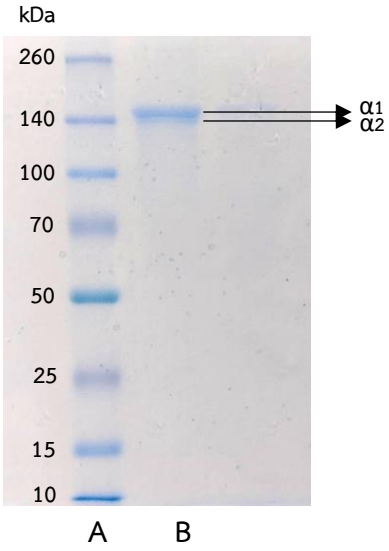
ตารางที่ 7 องค์ประกอบกรดอะมิโนของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล

กรดอะมิโน	**หน่วย**	**สารสกัดคอลลาเจนที่ 16 ชั่วโมง**		
		เกล็ดปลาเก๋า	**เกล็ดปลากะพงขาว**	**เกล็ดปลาช่อนทะเล**
Essential amino acids				
Arginine (Arg)	g/100 g	0.05	0.07	0.10
Histidine (His)	g/100 g	<0.03	<0.03	<0.03
Isoleucine (Iso)	g/100 g	Not detected	<0.03	<0.03
Leucine (Leu)	g/100 g	Not detected	<0.03	<0.03
Lysine (Lys)	g/100 g	0.03	<0.03	0.03
Methionine (Met)	g/100 g	0.03	<0.03	<0.03
Phenylalanine (Phe)	g/100 g	<0.03	<0.03	<0.03
Threonine (Thr)	g/100 g	<0.03	<0.03	0.03
Valine (Val)	g/100 g	<0.03	<0.03	0.03
Non-essential amino acids				
Alanine (Ala)	g/100 g	0.05	0.06	0.09
Aspartic acid (Asp)	g/100 g	0.03	0.04	0.05
Cystine (CySS)	g/100 g	Not detected	Not detected	Not detected
Glutamic acid (Glu)	g/100 g	0.04	0.06	0.07
Glycine (Gly)	g/100 g	0.07	0.12	0.16
Proline (Pro)	g/100 g	0.04	0.08	0.09
Serine (Ser)	g/100 g	<0.03	<0.03	0.04
Tryptophan (Try)	g/100 g	Not detected	Not detected	Not detected
Tyrosine (Tyr)	g/100 g	Not detected	Not detected	Not detected
Asparagine (Asp)	g/100 g	Not detected	Not detected	Not detected

กรดอะมิโน	หน่วย	สารสกัดคอลลาเจนที่ 16 ชั่วโมง		
		เกล็ดปลาเก๋า	เกล็ดปลากะพงขาว	เกล็ดปลาช่อนทะเล
Cysteine (Cys)	g/100 g	Not detected	Not detected	Not detected
Glutamine (Gln)	g/100 g	<0.03	0.06	0.04
Others				
Hydroxylysine	g/100 g	Not detected	Not detected	Not detected
Hydroxyproline	g/100 g	<0.03	0.03	0.03

7. การศึกษาชนิดของคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลโดยใช้เทคนิค SDS–PAGE

การศึกษารูปแบบหน่วยย่อยโปรตีนคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลาทะเลด้วยกรดอะซิติกร่วมกับไมโครเวฟ พบหน่วยย่อยของโปรตีนคอลลาเจนมีแถบโปรตีนเด่นเพียง 2 แถบ และเป็นไปได้ว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดปลาทะเลเป็นชนิดที่ 1 ซึ่งพบตำแหน่งของสาย α1 และ α2 ตามลำดับ มีขนาดของหน่วยย่อย 170 และ 155 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 รูปแบบโปรตีนคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลาทะเลโดยใช้เทคนิค SDS–PAGE
Lane A = protein marker; Lane B = crude extracted collagen from a marine fish scale

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*) พบว่ามีความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ร้อยละ 7.63 48.13 0.07 และ 25.92 ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) พบว่ามีความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ร้อยละ 8.55 55.05 0.07 และ 33.72 ตามลำดับ และองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) พบว่ามีความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ร้อยละ 11.07 51.95 0.05 และ 37.97 ตามลำดับ ทั้งนี้ เกล็ดปลาทะเลทั้งสามชนิดมีปริมาณโปรตีนและเถ้าร้อยละ 48.13 - 55.05 และ 25.92 - 37.97 ตามลำดับ ในขณะที่ มีปริมาณไขมันร้อยละ 0.05 - 0.07 สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าในเกล็ดปลาทะเลหลายชนิดมีองค์ประกอบของโปรตีนและเถ้าสูง แต่มีไขมันต่ำ เช่น เกล็ดปลานวลจันทร์ทะเล (Milkfish, *Chanos chanos*) มีองค์ประกอบของโปรตีน เถ้า และไขมัน ร้อยละ 53.6 33.0 และ 0.25 ตามลำดับ (Huang et al., 2018) เกล็ดปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) องค์ประกอบของโปรตีน เถ้า และไขมัน ร้อยละ 47.87 49.01 และ 0.01 ตามลำดับ (ฉลองขวัญ และคณะ, 2551) และเกล็ดปลาหมอทะเล หรือปลาเก๋ามังกร (Giant groupers, *Epinephelus lanceolatus*) มีองค์ประกอบของโปรตีน เถ้า และไขมัน ร้อยละ 41.49 44.93 และ 0.90 ตามลำดับ (Upasen et al., 2019) เป็นต้น ทั้งนี้ปริมาณโปรตีนที่ได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอวัยวะหรือส่วนที่นำมาวิเคราะห์ สายพันธุ์ และอาหารที่ปลาได้รับ นอกจากนี้ ยังพบว่าเกล็ดปลากะพงขาวมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดมากกว่าในเกล็ดปลานวลจันทร์ทะเล อีกทั้งปริมาณโปรตีนในเกล็ดปลาเก๋า เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาช่อนทะเล มีมากกว่าในเกล็ดปลากะพงแดง และเกล็ดปลาหมอทะเล สำหรับการนำเกล็ดปลาทะเลไปประยุกต์ใช้ จะเห็นได้ว่าเมื่อเทียบปริมาณโปรตีนในเกล็ดปลาทะเลที่ศึกษากับแหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำพบว่าโปรตีนในเกล็ดปลาทะเลมีปริมาณใกล้เคียงกับปลาป่น (55%) และมีค่าสูงกว่าหัวและเปลือกกุ้งป่น (40.6%) กากเมล็ดฝ้าย (41.7%) และกากถั่วเหลือง (46.9%) (ธนาภรณ์, 2557) จึงมีความเป็นไปได้ในการเลือกใช้เกล็ดปลาทะเลเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตอาหารสัตว์น้ำสำเร็จรูปที่ต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป ซึ่งอาจช่วยลดต้นทุนในการผลิตอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำได้ และนำไปสู่การพัฒนาเรื่องโภชนาการในสัตว์เศรษฐกิจ

เมื่อศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมันในเกล็ดปลาทะเลทั้งสามชนิด พบองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (SFAs) มากที่สุด โดยมีปริมาณ 39.59 - 48.91 %TFA พบกรดปาล์มิติก (16:0) และกรดเฮปตาเดคาโนอิก (17:0) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งการตรวจพบกรดปาล์มิติกเป็นกรดไขมันอิ่มตัวชนิดเด่นในเกล็ดปลาเก๋า 16.10 เปอร์เซ็นต์ เกล็ดปลากะพงขาว 14.57 เปอร์เซ็นต์ และเกล็ดปลาช่อนทะเล 17.82 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Suseno and others (2014) ที่ตรวจพบกรดไขมันอิ่มตัวปาล์มิติกมีปริมาณสูงที่สุดในทุกส่วนของปลา Spotted sardinella (*Amblygaster sirm*) ได้แก่ อวัยวะภายใน (Viscera) 19.98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนหัว 17.40 เปอร์เซ็นต์

เนื้อปลา 16.31 เปอร์เซ็นต์ และหนังปลา 18.25 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFAs) ปริมาณ 7.50 - 10.66 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับที่ตรวจพบในเกล็ดปลากะพงขาว 8.99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบกรดโอเลอิก (Oleic acid, 18:1n9) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวชนิดเด่นเช่นเดียวกันอีกด้วย แต่ในเกล็ดปลากะพงขาวมีปริมาณกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs; 4.62 เปอร์เซ็นต์) น้อยกว่าที่รายงานไว้ในทุกส่วนของปลา Spotted sardinella (16.92 - 30.95 เปอร์เซ็นต์) คิดเป็น 4-6 เท่า นอกจากนี้ การตรวจพบกรดเฮปตาเดคาโนอิกเป็นกรดไขมันอิ่มตัวชนิดเด่น สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Dutta and Dutta (2013) ที่ตรวจพบกรดไขมันชนิดนี้ปริมาณมากที่สุดบริเวณเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาไหล (Mud eel, *Monopterus chuchia*) อีกทั้งการศึกษาปริมาณและชนิดของกรดไขมันจากเกล็ดปลาแซลมอน (*Salmo salar*) และเกล็ดปลากระโห้อินเดีย (*Catla catla*) พบกรดไขมันกลุ่มคาร์บอน 16 และ 18 เป็นส่วนใหญ่ โดยมากพบกรดไขมัน 16:0 (Palmitic acid) ในเกล็ดปลาแซลมอน และกรดไขมัน 18:0 (Stearic acid) ในเกล็ดปลากระโห้อินเดีย อย่างไรก็ตาม ยังพบกรดไขมันไม่อิ่มตัว ทั้งโอเมกา 3 6 และ 9 ในเกล็ดปลาแซลมอนอีกด้วย ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันจากเกล็ดปลา ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม (Grahl-Nielsen and Glover, 2010; Prabu et al., 2015)

สำหรับวิธีการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลที่ให้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 2.5 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง คือ การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและเม็ดสีออกจากตัวอย่างเกล็ดปลาด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ในอัตราส่วน 1:10 กวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างเกล็ดปลาด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 จึงทำการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:10 โดยนำเข้าเครื่องไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 850 วัตต์ เป็นเวลา 4 นาที สอดคล้องกับรายงานการศึกษาซึ่งพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา คือ การใช้กรดอะซิติกร่วมกับคลื่นไมโครเวฟที่ 400 วัตต์ เป็นเวลา 5 นาที ถือว่าเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีของการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาที่มีประสิทธิภาพ (Suo-Lian, Huai-Bin and Dong-Jiao, 2017) เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยไม่มีการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วย ในเกล็ดปลาทะเลชนิดต่างๆ จากญี่ปุ่นและเวียดนาม ซึ่งให้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนคิดเป็นร้อยละ 0.43 - 1.5 ต่อน้ำหนักแห้ง (Thuy, Okazaki and Osako, 2014) อีกทั้งการศึกษาในเกล็ดปลา Miiuy croaker (*Miichthys Miiuy*) ซึ่งพบว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนคิดเป็นร้อยละ 0.67 ในขณะที่การสกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เปปซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนมากกว่า คิดเป็นร้อยละ 3.87 (Li et al., 2018) ทั้งนี้ ร้อยละของผลผลิตคอลลาเจนที่สกัดได้มีความแตกต่างกันในเกล็ดปลาแต่ละชนิด สอดคล้องกับองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบในเกล็ดปลานั้นๆ (Chinh et al., 2019)

รายงานการศึกษาสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาพบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical) อนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical) อนุมูล

อิสระซุปเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical) และอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical) ของเปปไทด์คอลลาเจนจากเกล็ดปลา Croceine Croaker (*Pseudosciaena crocea*) (Wang et al., 2013) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอสและความสามารถในการรีดิวซเฟอรริกของสารตานอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ของไฮโดรไลซ์คอลลาเจนจากโอซีอีนเกล็ดปลาแซลมอน (Sae-leaw and Benjakul, 2018) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชและอนุมูลอิสระเอบีทีเอสของเปปไทด์คอลลาเจนจากเกล็ดปลานวลจันทร์ทะเล (Milkfish) (Chen et al., 2018) เป็นต้น การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นไมโครเวฟ ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ดีกว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค นอกจากนี้ สารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 14.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ สารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้อ่อนถึงปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0126 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0036 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐานอนุพันธ์ของวิตามินอี ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0134 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0029 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเลที่สกัดด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นไมโครเวฟ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Nurilmala and others (2020) ซึ่งพบว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.75 โมลาร์ จากหนังปลา Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวที่สกัดด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Fawzya and others (2020) ซึ่งพบว่าสารสกัดคอลลาเจนจากปลิงทะเลสีทอง (*Teripang emas*) ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดอะซิติกและเอนไซม์นิวเทรส (Neutrase) 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 นาที ให้ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากหนังของปลา Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) ได้ทำการจัดกลุ่มความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระจากค่า IC_{50} โดย ค่า IC_{50} น้อยกว่า 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ มีฤทธิ์สูงมาก ค่า IC_{50} 0.05 – 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ มีฤทธิ์สูง ค่า IC_{50} 0.10 – 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ มีฤทธิ์ปานกลาง ค่า IC_{50} 0.15 – 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ มีฤทธิ์ต่ำ และค่า IC_{50} มากกว่า 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ มีฤทธิ์ต่ำมาก (Nurilmala et al., 2020) ทั้งนี้ การมีค่าความ

เข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) ต่ำ แสดงว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี ในทางกลับกัน ถ้าสารสกัดหยาบมีค่า IC_{50} สูง แสดงว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ไม่ดี

การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลด้วยเครื่อง FTIR พบจำนวนทั้งหมด 5 พีค คือ amide A พบที่เลขคลื่น 3281.10 cm^{-1} amide B พบที่เลขคลื่น 2935.61 cm^{-1} amide I พบที่เลขคลื่น 1628.22 cm^{-1} amide II พบที่เลขคลื่น 1547.99 cm^{-1} และ amide III พบที่เลขคลื่น 1237.76 cm^{-1} สอดคล้องกับผลการศึกษาโครงสร้างของคอลลาเจนจากเกล็ดปลาชนิดต่างๆ เช่น การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนจากเกล็ดปลา Northern pike ซึ่งสกัดด้วยวิธี ASC และ PSC พบจำนวน 5 พีค ได้แก่ amide A (3312 cm^{-1}) amide B (3076 cm^{-1}) aamide I (1653 cm^{-1}) amide II (1548 cm^{-1}) และ amide III (1235-1237 cm^{-1}) (Riaz et al., 2018) โดยทั่วไป amide A ตรวจพบบริเวณเลขคลื่น 3440 – 3300 สัมพันธ์กับหมู่ฟังชันการสั่นแบบยืดหดของพันธะ N-H amide B ตรวจพบบริเวณเลขคลื่น 3080 – 2889 สัมพันธ์กับหมู่ฟังชันการสั่นแบบยืดหดแบบไม่สมมาตรของพันธะ CH_2 amide I ตรวจพบบริเวณเลขคลื่น 1700 – 1600 สัมพันธ์กับหมู่ฟังชันการสั่นแบบยืดหดของพันธะ C=O amide II ตรวจพบบริเวณเลขคลื่น 1580 – 1500 สัมพันธ์กับหมู่ฟังชันการสั่นแบบบิดงอของพันธะ N-H และ amide III ตรวจพบบริเวณเลขคลื่น 1350 – 1200 สัมพันธ์กับหมู่ฟังชันการสั่นแบบบิดงอของพันธะ N-H และการสั่นแบบยืดหดของพันธะ C-H (Herawati et al., 2022)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล พบกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูง 4 อันดับแรก คือ Glycine (Gly) Proline (Pro) Alanine (Ala) และ Glutamic acid (Glu) แต่ไม่พบกรดอะมิโน Cystine (Cys) Tryptophan (Try) Tyrosine (Tyr) Asparagine (Asp) Cysteine (Cys) และ Hydroxylysine ในสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากปลาทะเลที่สกัดด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลา Miiuy croaker ซึ่งพบ Gly เป็นกรดอะมิโนที่มีปริมาณมากที่สุดทั้งการสกัดด้วยวิธี ASC และ PSC ตามมาด้วย Ala และ Pro ตามลำดับ (Li et al., 2018) อีกทั้ง ยังพบลำดับของปริมาณของกรดอะมิโนในรูปแบบดังกล่าว จากผลการศึกษาของคอลลาเจนจากเกล็ดปลา Seabass Black carp และ Tilapia (Salvatore et al., 2020) ทั้งนี้ ไกลซีนเป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในโมเลกุลคอลลาเจน โดยมีประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด มีลักษณะการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนซ้ำๆกันเป็น Gly-Pro-Y หรือ Gly-X-Hyp นั่นเอง

การศึกษารูปแบบโปรตีนคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลาทะเลโดยเทคนิค SDS–PAGE พบหน่วยย่อยตำแหน่งของสาย α1 และ α2 ซึ่งเป็นไปได้ว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดปลาทะเลในการศึกษาครั้งนี้เป็นชนิดที่ 1 (Type I) สอดคล้องกับผลการศึกษาชนิดของคอลลาเจนในเกล็ดปลา *Pagrus major* และ *Oreochromis niloticas* (Ikoma et al., 2003) เกล็ดปลา *Labeo rohita*

(Rohu) และ *Catla catla* (Catla) (Pati, Adhikari and Dhara, 2010) เกล็ดปลากระบอกดำ (มะลิวัลย์ และคณะ, 2558) เกล็ดปลานวลจันทร์ทะเล (ปวเรศวร์ และ สุภาพร, 2564) เกล็ดปลา *Carassius auratus* (Fang et al., 2014) และเกล็ดปลา Lizard fish (*Saurida* spp.) และ Horse mackerel (*Trachurus japonicus*) จากประเทศญี่ปุ่นและประเทศเวียดนาม และเกล็ดปลา Grey mullet (*Mugil cephalis*) Flying fish (*Cypselurus melanurus*) และ Yellowback seabream (*Dentex tumifrons*) จากประเทศญี่ปุ่น (Thuy, Okazaki and Osako, 2014)

สรุปได้ว่า องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาเก๋า เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาช่อนทะเล มีโปรตีนรวมในปริมาณร้อยละ 48.13 - 55.05 กรัมของน้ำหนักแห้ง มีปริมาณเถ้าหรือแร่ธาตุร้อยละ 25.92 - 37.97 กรัมของน้ำหนักแห้ง มีปริมาณความชื้นร้อยละ 7.63 – 11.07 กรัมของน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณไขมันรวมร้อยละ 0.05 - 0.07 กรัมของน้ำหนักแห้ง ในเกล็ดปลาทะเลทั้งสามชนิดมีองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (SFAs) มากที่สุด ปริมาณ 39.59 - 48.91 %TFA โดยมีกรดปาล์มิติก (16:0) และกรดเฮปตาเดคาโนอิก (17:0) เป็นกรดไขมันอิ่มตัวชนิดเด่น ในขณะที่ ปริมาณกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFAs; 8.99 %TFA) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs; 4.62 %TFA) พบมากเฉพาะในเกล็ดปลากะพงขาว สำหรับวิธีการสกัดคอลลาเจนที่มีประสิทธิภาพสูง คือ การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและเม็ดสีออกจากตัวอย่างเกล็ดปลาด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ในอัตราส่วน 1:10 กวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างเกล็ดปลาด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 จึงทำการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:10 ร่วมกับคลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 850 วัตต์ เป็นเวลา 4 นาที โดยให้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนคิดเป็นร้อยละ 2.5 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล พบว่าการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกร่วมกับคลื่นไมโครเวฟให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ดี โดยสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงขาวมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี ในขณะที่สารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาช่อนทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดี ซึ่งสารสกัดหยาบคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้อ่อนถึงปานกลาง การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลด้วยเทคนิค FTIR พบพีค Amide A ที่เลขคลื่น 3281.10 cm^{-1} Amide B พบที่เลขคลื่น 2935.61 cm^{-1} Amide I พบที่เลขคลื่น 1628.22 cm^{-1} Amide II พบที่เลขคลื่น 1547.99 cm^{-1} และ Amide III พบที่เลขคลื่น 1237.76 cm^{-1} การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเล พบกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูง 4 อันดับแรก คือ Gly Pro Ala และ Glu การศึกษารูปแบบโปรตีนคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลาทะเลโดยเทคนิค SDS–PAGE พบหน่วยย่อยตำแหน่งของสาย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ซึ่งมีขนาดของหน่วยย่อย 170 และ 155 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เป็นไปได้ว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดปลาทะเลเป็นชนิดที่ 1

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม. (2564). *แผนปฏิบัติการด้านการขับเคลื่อนการพัฒนาประเทศไทยด้วยโมเดลเศรษฐกิจ BCG พ.ศ. 2564-2570*, 213 หน้า.

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. (2560). การสกัดและวิธีวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ* 3(1), 86-94.

กรรณาภรณ์ อินทชัย, ชัญญานุช ภู่ทิม, วัชระ กสิณฤกษ์, ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา และ บดินทร์ บุตรอินทร์. (2556). การประยุกต์ใช้เทคนิค SDS-PAGE เพื่อตรวจหาปริมาณโปรตีน Extracellular Recombinant Single-chain Variable Fragment Anti-HIV-1 p17 จากโปรตีนรวม. *วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่*, 46(2), 107-121.

ฉลองขวัญ พิพัฒนเจริญวงศ, วรรณวิบูลย กาญจนกุญชร และ วรรณี จิรภาคยกุล. (2551). การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*). ใน*การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร*, กรุงเทพมหานคร, หน้า 33-40, 677 หน้า.

ทนงศักดิ์ โตเจริญ. (2556). ปริมาณผลได้และรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลากระบอกดำ (*Liza subviridis*) ด้วยเปปซินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา, 67 หน้า.

ปฏิวิทย์ ลอยพิมาย. (2555). การประเมินความสามารถต้านออกซิเดชันรวมในหลอดทดลอง. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม* 31(2), 164-170.

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ. (2563). *การสกัดคอลลาเจนจากเศษเหลือของการแปรรูปสัตว์น้ำและการนำไปใช้ประโยชน์*. กลุ่มวิจัยการประเมินความเสี่ยงวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, 6 หน้า.

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ และ สุภาพร ศศิปภาโชติมา. (2564). *การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานวลจันทร์ทะเล*. กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 37 หน้า.

พัชรพงษ์ พานิช. (2561). *การใช้ประโยชน์จากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายเป็นอาหารเสริมและผลิตภัณฑ์เวชสำอาง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 72 หน้า.

มะลิวัลย์ คุตะโค, ทนงศักดิ์ โตเจริญ, มลฤดี สนธิ, รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และ จันทร์จรัส วัฒนะโชติ. (2558). ปริมาณผลผลิตและรูปแบบโปรตีนคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระบอกดำ (*Liza*

subviridis) ที่สกัดด้วยเปปซินความเข้มข้นแตกต่างกัน. *แก่นเกษตร*, 43, ฉบับพิเศษ 1, หน้า 562-567.

ศิรินิตย์ ธารธาดา และ ปฐมาพร อำนาจอนันต์. (2561). เทคโนโลยี Fourier Transform Infrared Spectroscopy: ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้. *วารสารวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์และเทคโนโลยี*, 2(1), 29-33.

Ahmed, M., Verma, A. K. and Patel, R. (2020). Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18, 100315. doi:10.1016/j.scp.2020.100315

Ali, A. M. M., Benjakul, S. and Kishimura, H. (2017). Molecular characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the scales of golden carp (*Probarbus jullieni*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 450-457. doi:10.9755/ejfa.2016-09-1316

Alvarado, K., Durand, E., Vaysse, L., Liengprayoon, S., Gaillet, S., Coudray, C., Casas, F. and Feillet-Coudray, C. (2021). Potential beneficial effects of furan fatty acids, bioactive food lipids. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, 56(2), 117-125. doi:10.1016/j.cnd.2021.01.006

Ampitiya, A. G. D. M., Gonapinuwala, S. T., Fernando, C. A. N. and De Croos, M. D. S. T. (2023). Extraction and characterisation of type I collagen from the skin offcuts generated at the commercial fish processing centres. *Journal of Food Science and Technology*, 60(2), 484-493. doi:10.1007/s13197-022-05630-x

Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official methods of analysis (17th ed)*. Washington, DC: Author.

Aziz, N. A. A., Salim, N., Zarei, M., Saari, N. and Yusoff, F. Md. (2021). Extraction, anti-tyrosinase, and antioxidant activities of the collagen hydrolysate derived from *Rhopilema hispidum*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(1), 44-53. doi:10.1080/10826068.2020.1789991

Bhagwat, P. K. and Dandge, P. B. (2016). Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 234-240. doi:10.1016/j.bcab.2016.06.010

Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G. and Petibois, C. (2009). Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395, 829-37. doi:10.1007/s00216-009-3019-y

Cao, S., Cai, J., Ying, S., Chen, T., Liu, L., Yang, H., Ma, J., He, L. and Qi, X. (2022). Characteristics comparison of collagens from squid skin by different extraction methods. *Food Science and Technology*, 42, e69422, 1-8. doi:10.1590/fst.69422

Chen, Y. P., Liang, C. H., Wu, H. T., Pang, H. Y., Chen, C., Wang, G. H. and Chan, L. P. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory capacities of collagen peptides from milkfish (*Chanos chanos*) scales. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2310-2317. doi:10.1007/s13197-018-3148-4

Chinh, N. T., Nghia, T. H., Tuan, H. H., Manh, V. Q., Trung, V. Q., Doanh, T. C. and Hoang, T. (2020). Study on characteristics of collagen extracted from fresh-water fish scales by bio-chemical method. *Vietnam Journal of Chemistry*, 58(5E12), 308-315.

Chinh, N. T., Manh, V. Q., Trung, V. Q., Lam, T. D., Huynh, M. D., Tung, N. Q., Trinm, N. D. and Hoang, T. (2019). Characterization of collagen derived from tropical freshwater carp fish scale wastes and its amino acid sequence. *Natural Product Communications*, 14(7), 1934578X19866288.

Christie, W. W. (2003). *Lipid analysis: isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids*. Bridgwater, England: Oily press.

Coppola, D., Oliviero, M., Vitale, G. A., Lauritano, C., D'Ambra, I., Iannace, S. and de Pascale, D. (2020). Marine collagen from alternative and sustainable sources: Extraction, processing and applications. *Marine drugs*, 18(4), 214, 1-23. doi:10.3390/md18040214

Dutta, M. I. T. A. and Dutta, P. I. N. A. K. (2013). A study of the fatty acid profile in the muscle of *Monopterus chuchia*. *Oriental Journal of Chemistry*, 29(4), 1501-1505.

Fang, Z., Wang, Y., Feng, Q., Kienzle, A. and Müller, W. E. (2014). Hierarchical structure and cytocompatibility of fish scales from *Carassius auratus*. *Materials Science and Engineering C*, 43, 145-152.

Fawzya, Y. N., Putra, N. A., Witarto, A. B. and Patantis, G. (2020). Golden sea cucumber: Identification and the antioxidant activity of its collagen

hydrolysates. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 15, 119-129.

Fenglin, H., Ruili, L., Bao, H. and Liang, M. (2004). Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. *Fitoterapia*, 75(1), 14-23. doi:10.1016/j.fitote.2003.07.003

Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanlet, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Grahl-Nielsen, O. and Glover, K. A. (2010). Fatty acids in fish scales. *Marine Biology*, 157, 1567-1576. doi:10.1007/s00227-010-1430-8

Hashim, P., Mohd Ridzwan, M. S., Bakar, J. and Mat Hashim, D. (2015). Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22(1), 1-8.

Herawati, E., Akhsanitaqwim, Y., Agnesia, P., Listyawati, S., Pangastuti, A. and Ratriyanto, A. (2022). In Vitro Antioxidant and Antiaging Activities of Collagen and Its Hydrolysate from Mackerel Scad Skin (*Decapterus macarellus*). *Marine Drugs*, 20(8), 516. doi:10.3390/md20080516

Huang, C. Y., Tsai, Y. H., Hong, Y. H., Hsieh, S. L. and Huang, R. H. (2018). Characterization and antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activities of gelatin hydrolysates prepared from extrusion-pretreated milkfish (*Chanos chanos*) scale. *Marine Drugs*, 16(10), 346. doi:10.3390/md16100346

Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D. and Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. *International journal of biological macromolecules*, 32(3-5), 199-204.

Jafari, H., Lista, A., Siekapen, M. M., Ghaffari-Bohlouli, P., Nie, L., Alimoradi, H. and Shavandi, A. (2020). Fish collagen: extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. *Polymers*, 12(10), 2230. doi:10.3390/polym12102230

Jin, H. X., Xu, H. P., Li, Y., Zhang, Q. W. and Xie, H. (2019). Preparation and evaluation of peptides with potential antioxidant activity by microwave assisted enzymatic hydrolysis of collagen from sea cucumber *Acaudina Molpadioides*

obtained from Zhejiang Province in China. *Marine Drugs*, 17, 169, 1-14. doi:10.3390/md17030169

Kuwahara, J. (2021). Extraction of type I collagen from tilapia scales using acetic acid and ultrafine bubbles. *Processes*, 9(2), 288.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Li, P. H., Lu, W. C., Chan, Y. J., Ko, W. C., Jung, C. C., Huynh, D. T. L. and Ji, Y. X. (2020). Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics. *Aquaculture* 515, 734590, 1-8. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734590

Li, L. Y., Zhao, Y. Q., He, Y., Chi, C. F. and Wang, B. (2018). Physicochemical and antioxidant properties of acid-and pepsin-soluble collagens from the scales of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Marine Drugs*, 16(10), 394. doi:10.3390/md16100394

Mirzapour-Kouhdasht, A., Sabzipour, F., Taghizadeh, M. S. and Moosavi-Nasab, M. (2019). Physicochemical, rheological, and molecular characterization of colloidal gelatin produced from Common carp by-products using microwave and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Texture Studies*, 50(5), 416-425. doi:10.1111/jtxs.12408

Mori, H., Tone, Y., Shimizu, K., Zikihara, K., Tokutomi, S., Ida, T., Ihara. H. and Hara, M. (2013). Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabis saira*). *Materials Science and Engineering C*, 33(1), 174-181. doi:10.1016/j.msec.2012.08.025

Muralidharan, N., Shakila, R. J., Sukumar, D. and Jeyasekaran, G. (2013). Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *Journal of food science and technology*, 50, 1106-1113. doi:10.1007/s13197-011-0440-y

Muthumari, K., Anand, M. and Maruthupandy, M. (2016). Collagen extract from marine finfish scales as a potential mosquito larvicide. *The Protein Journal*, 35, 391-400. doi:10.1007/s10930-016-9685-7

Nashchekina, Y. A., Starostina, A. A., Trusova, N. A., Sirotkina, M. Y., Lihachev, A. I. and Nashchekin, A. V. (2020). Molecular and fibrillar structure collagen analysis by

FTIR spectroscopy. *Journal of Physics: Conference Series*, 1697(1), 012053. IOP Publishing. doi:10.1088/1742-6596/1697/1/012053

Nurilmala, M., Hizbullah, H. H., Karnia, E., Kusumaningtyas, E. and Ochiai, Y. (2020). Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin, and the derived peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin. *Marine drugs*, 18(2), 98.

Pang, S., Chang, Y. P. and Woo, K. K. (2013). The Evaluation of the suitability of fish wastes as a source of collagen. *2nd International Conference on Nutrition and Food Sciences*, Singapore, 53, 77-81. doi:10.7763/ipcbee.2013.v53.15

Pati, F., Adhikari, B. and Dhara, S. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource technology*, 101(10), 3737-3742. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.133

Prabu, K., Shankarlal, S. and Natarajan, E. (2015). Fatty acid profile of fish scale of *Catla catla*. *African Journal of Biotechnology*, 14(21), 1828-1831. doi:10.5897/AJB12.1164

Ramanathan, G., Singaravelu, S., Raja, M. D., Sobhana, S. S. and Sivagnanam, U. T. (2014). Extraction and characterization of collagen from the skin of Arothron stellatus fish-A novel source of collagen for tissue engineering. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 4(3), 203-209. doi:10.1166/jbt.2014.1157

Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S. Z., Rahim, A., Rizvi, S. A. A. and Rehman, I. U. (2018). FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9), 703-746. doi:10.1080/05704928.2018.1426595

Sae-leaw, T. and Benjakul, S. (2018). Antioxidant activities of hydrolysed collagen from salmon scale ossein prepared with the aid of ultrasound. *International Journal of Food Science and Technology*, 53, 2786-2795. doi:10.1111/ijfs.13891

Salvatore, L., Gallo, N., Natali, M. L., Campa, L., Lunetti, P., Madaghiele, M., Blasi, F. S., Corallo, A., Capobianco, L. and Sannino, A. (2020). Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. *Materials Science and Engineering C*, 113, 110963. doi:10.1016/j.msec.2020.110963

Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P. and Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, 23(3), 913.

Silvipriya, K. S., Kumar, K. K., Bhat, A. R., Kumar, B. D., John, A. and Lakshmanan, P. (2015). Collagen: Animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(03), 123-127. doi:10.7324/japs.2015.50322

Sobczak-Kupiec, A., Drabczyk, A., Florkiewicz, W., Głąb, M., Kudłacik-Kramarczyk, S., Słota, D., Tomala, A. and Tyliszczak, B. (2021). Review of the applications of biomedical compositions containing hydroxyapatite and collagen modified by bioactive components. *Materials*, 14(9), 2096.

Suo-Lian, W., Huai-Bin, K. and Dong-Jiao, L. (2017). Technology for extracting effective components from fish scale. *Journal of Food Science and Engineering*, 7, 351-358. doi:10.17265/2159-5828/2017.07.003

Suseno, S. H., Syari, C., Zakiyah, E. R., Jacoeb, A. M., Izaki, A. F., Saraswati, S. and Hayati, S. (2014). Chemical composition and fatty acid profile of small pelagic fish (*Amblygaster sirm* and *Sardinella gibbosa*) from Muara Angke, Indonesia. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(3), 1153-1158.

Thuy, L. T. M., Okazaki, E. and Osako, K. (2014). Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry*, 149, 264-270. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.094

Upasen, S., Naeramitmarnsuk, K., Antonio, C., Roces, S., Morillas, H. and Wattanachai, P. (2019). Acid-pepsin soluble collagen from saltwater and freshwater fish scales. *Engineering Journal*, 23(5), 183-195. doi:10.4186/ej.2019.23.5.183

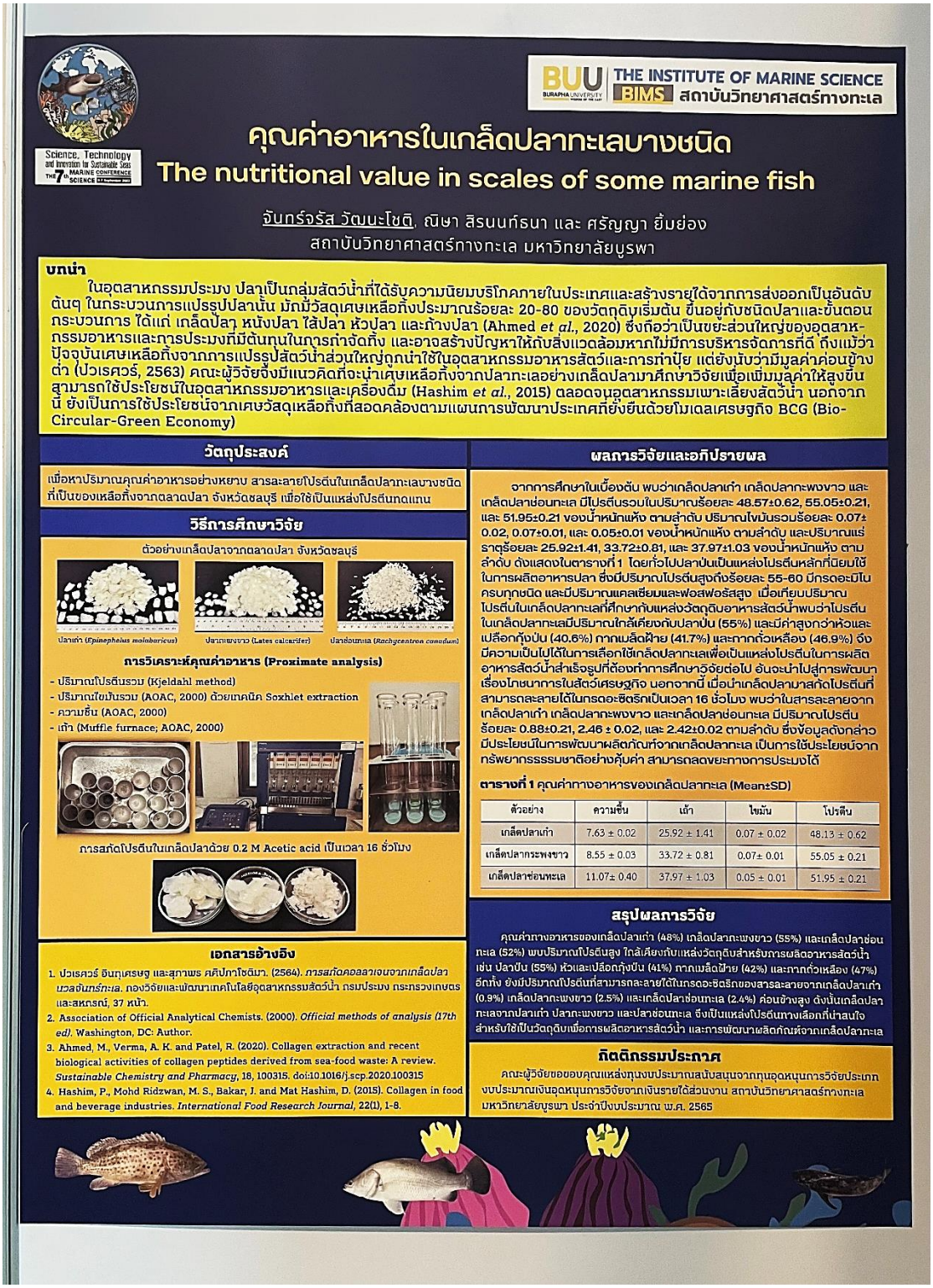
Wang, B., Wang, Y. M., Chi, C. F., Luo, H. Y., Deng, S. G. and Ma, J. Y. (2013). Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Marine Drugs*, 11, 4641-4661. doi:10.3390/md11114641

Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y. and Li, X. (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*, 16(4), 3444-3455. doi:10.3390/molecules16043444

Zata, H. F., Chiquita, P. and Shafira, K. (2020). Collagen from marine source for regenerative therapy: a literature review. *AIP Conference Proceedings* 2314, 050017. doi:10.1063/5.0036110

การนำเสนอผลงาน

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, ณิษา สิรนนท์ธนา และ ศรัญญา ยิ้มย่อง. (2565). คุณค่าอาหารในเกล็ดปลาทะเลบางชนิด. การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์ทางทะเล ครั้งที่ 7, 5-7 กันยายน 2564 โรงแรม เดอะ เบอร์เคลี่ย์ ประตูน้ำ กรุงเทพมหานคร.



THE INSTITUTE OF MARINE SCIENCE
BIMS สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล
BURAPHA UNIVERSITY

Science, Technology and Innovation for Sustainable Seas
THE 7th MARINE CONFERENCE SCIENCE

คุณค่าอาหารในเกล็ดปลาทะเลบางชนิด
The nutritional value in scales of some marine fish

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, ณิษา สิรนนท์ธนา และ ศรัญญา ยิ้มย่อง
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

บทนำ

ในอุตสาหกรรมประมง ปลาเป็นกลุ่มสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมบริโภคภายในประเทศและสร้างรายได้จากการส่งออกเป็นอันดับต้นๆ ในกระบวนการแปรรูปปลานั้น มักมีวัสดุเศษเหลือทิ้งประมาณร้อยละ 20-80 ของวัตถุดิบเริ่มต้น ขึ้นอยู่กับชนิดปลาและขั้นตอนกระบวนการ ได้แก่ เกล็ดปลา หนังปลา ไส้ปลา หัวปลา และก้างปลา (Ahmed *et al.*, 2020) ซึ่งถือว่าเป็นขยะส่วนใหญ่ของอุตสาหกรรมอาหารและการประมงที่มีต้นทุนในการกำจัดทิ้ง และอาจสร้างปัญหาให้กับสิ่งแวดล้อมหากไม่มีการบริหารจัดการที่ดี ถึงแม้ว่าปัจจุบันเศษเหลือทิ้งจากการแปรรูปสัตว์น้ำส่วนใหญ่ถูกนำใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และการทำปุ๋ย แต่ยังนับว่ามีมูลค่าค่อนข้างต่ำ (ปวเรศวร์, 2563) คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำเศษเหลือทิ้งจากปลาทะเลอย่างเกล็ดปลามาศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มมูลค่าให้สูงขึ้น สามารถใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Hashim *et al.*, 2015) ตลอดจนอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ นอกจากนี้ ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากเศษวัสดุเหลือทิ้งที่สอดคล้องตามแผนการพัฒนาประเทศที่ยั่งยืนด้วยโมเดลเศรษฐกิจ BCG (Bio-Circular-Green Economy)

วัตถุประสงค์

เพื่อหาปริมาณคุณค่าอาหารอย่างหยาบ สารละลายโปรตีนในเกล็ดปลาทะเลบางชนิดที่เป็นของเหลือทิ้งจากตลาดปลา จังหวัดชลบุรี เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทน

วิธีการศึกษาวิจัย

ตัวอย่างเกล็ดปลาจากตลาดปลา จังหวัดชลบุรี

ปลาเก๋า (*Epinephelus moiabaricus*) ปลากะพงขาว (Lates calcarifer) ปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*)

การวิเคราะห์คุณค่าอาหาร (Proximate analysis)

- ปริมาณโปรตีนรวม (Kjeldahl method)
- ปริมาณไขมันรวม (AOAC, 2000) ด้วยเทคนิค Soxhlet extraction
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- เถ้า (Muffle furnace; AOAC, 2000)

การสกัดโปรตีนในเกล็ดปลาด้วย 0.2 M Acetic acid เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาในเบื้องต้น พบว่าเกล็ดปลาเก๋า เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาช่อนทะเล มีโปรตีนรวมในปริมาณร้อยละ 48.57±0.62, 55.05±0.21, และ 51.95±0.21 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ปริมาณไขมันรวมร้อยละ 0.07±0.02, 0.07±0.01, และ 0.05±0.01 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และปริมาณแร่ธาตุร้อยละ 25.92±1.41, 33.72±0.81, และ 37.97±1.03 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยทั่วไปปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลักที่นิยมใช้ในการผลิตอาหารปลา ซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 55-60 มีกรดอะมิโนครบทุกชนิด และมีปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสสูง เมื่อเทียบปริมาณโปรตีนในเกล็ดปลาทะเลที่ศึกษากับแหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำพบว่าโปรตีนในเกล็ดปลาทะเลมีปริมาณใกล้เคียงกับปลาป่น (55%) และมีค่าสูงกว่าหัวและเปลือกกุ้งป่น (40.6%) กากเมล็ดฝ้าย (41.7%) และกากถั่วเหลือง (46.9%) จึงมีความเป็นไปได้ในการเลือกใช้เกล็ดปลาทะเลเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตอาหารสัตว์น้ำสำเร็จรูปที่ต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป อันจะนำไปสู่การพัฒนาเรื่องโภชนาการในสัตว์เศรษฐกิจ นอกจากนี้ เมื่อนำเกล็ดปลามาสกัดโปรตีนที่สามารถละลายได้ในกรดอะซิติกเป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าในสารละลายจากเกล็ดปลาเก๋า เกล็ดปลากะพงขาว และเกล็ดปลาช่อนทะเล มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.88±0.21, 2.46 ± 0.02, และ 2.42±0.02 ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเกล็ดปลาทะเล เป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติอย่างคุ้มค่า สามารถลดขยะทางการประมงได้

ตารางที่ 1 คุณค่าทางอาหารของเกล็ดปลาทะเล (Mean±SD)

ตัวอย่าง	ความชื้น	เถ้า	ไขมัน	โปรตีน
เกล็ดปลาเก๋า	7.63 ± 0.02	25.92 ± 1.41	0.07 ± 0.02	48.13 ± 0.62
เกล็ดปลากระพงขาว	8.55 ± 0.03	33.72 ± 0.81	0.07± 0.01	55.05 ± 0.21
เกล็ดปลาช่อนทะเล	11.07± 0.40	37.97 ± 1.03	0.05 ± 0.01	51.95 ± 0.21

สรุปผลการวิจัย

คุณค่าทางอาหารของเกล็ดปลาเก๋า (48%) เกล็ดปลากะพงขาว (55%) และเกล็ดปลาช่อนทะเล (52%) พบปริมาณโปรตีนสูง ใกล้เคียงกับแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารสัตว์น้ำ เช่น ปลาป่น (55%) หัวและเปลือกกุ้งป่น (41%) กากเมล็ดฝ้าย (42%) และกากถั่วเหลือง (47%) อีกทั้ง ยังมีปริมาณโปรตีนที่สามารถละลายได้ในกรดอะซิติกของสารละลายจากเกล็ดปลาเก๋า (0.9%) เกล็ดปลากะพงขาว (2.5%) และเกล็ดปลาช่อนทะเล (2.4%) ค่อนข้างสูง ดังนั้นเกล็ดปลาทะเลจากปลาเก๋า ปลากะพงขาว และปลาช่อนทะเล จึงเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตอาหารสัตว์น้ำ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเกล็ดปลากะทะเล

เอกสารอ้างอิง

1. ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ และสุภาพร ศศิปภาโชติมา. (2564). *การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลาบวลจันทร์กะเล*. กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 37 หน้า.
2. Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official methods of analysis (17th ed)*. Washington, DC: Author.
3. Ahmed, M., Verma, A. K. and Patel, R. (2020). Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18, 100315. doi:10.1016/j.scp.2020.100315
4. Hashim, P., Mohd Ridzwan, M. S., Bakar, J. and Mat Hashim, D. (2015). Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22(1), 1-8.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณแหล่งทุนงบประมาณสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทงบประมาณเงินอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ส่วนงาน สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565