รายงานการวิจัย

การศึกษาบางคุณสมบัติของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*)
และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

Study on some properties of collagen from sandfish (*Holothuria scabra*) and black sea cucumber (*Holothuria leucospilota*)

ศรัณย์ รักษาพราหมณ์
วิจิตรา ตุ้งซี่

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
พ.ศ. 2558

ชื่องานวิจัย การศึกษาบางคุณสมบัติของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

ผู้วิจัย นายศรัณย์ รักษาพราหมณ์ และนางสาววิจิตรา ตุ้งซี่

คณะ เทคโนโลยีการเกษตร

ปี 2560

บทคัดย่อ

การศึกษาบางคุณสบัติของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) พบว่าผนังลำตัวของปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ 100 กรัม ของน้ำหนักเปียก สามารถสกัดคอลลาเจนหยาบได้ 4.09 และ 10.95 กรัม ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และสามารถสกัด pepsin-solubilized collagen (PSC) จากคอลลาเจนหยาบได้ประสบผลสำเร็จปริมาณค่อนข้างสูง คือ 58.70 และ 66.46% ตามลำดับ PSC ประกอบด้วยไฮดรอกซีโปรลีนร้อยละ 6.5 และ 7.0 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ มีค่า transition temperature (T_{max}) เท่ากับ 48.94 และ 50.88 °C ตามลำดับ สามารถดูดกลืนแสงยูวีสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 234 และ 235 นาโนเมตร ตามลำดับ มีค่าการละลายสูงที่สุดที่ pH 1 ใน PSC ของปลิงทะเลทั้ง 2 ชนิด

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

Research Title Study on some properties of collagen from sandfish (*Holothuria scabra*) and black sea cucumber (*Holothuria leucospilota*)

Researcher Sarun Rucksapram and Wijittra Tungse

Faculty Agricultural Technology

Year 2017

Abstract

Study on some properties of collagen from sandfish (*Holothuria scabra*) and black sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) was investigated. It was found that 4.09 and 10.95 gram dry weight of extracted crude collagen were obtained from 100 gram wet weight of sea cucumber body wall, *H. scabra* and *H. leucospilota*, respectively. As high as 58.70 and 66.46 % of pepsin-solubilized collagen (PSC) were successfully isolated from the crude collagen fibril of *H. scabra* and *H. leucospilota*, respectively. They were composed of 6.5 and 7.0%, respectively hydroxyproline by PSC dry weight. PSC exhibited transition temperature (T_{max}) at 48.94 and 50.88 °C, respectively. And maximum UV absorbance at 234 and 235 nm., respectively. The both species of PSC from sea cucumber had the highest solubility at pH 1.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ นางสาวสุไวบ๊ะ สิลสาวรีย์ นางสาวสุปรีดา ด้วงมาก นางสาวปวิชญา พงศ์พิริยะปัญญา และนายอิบรอฮีม หมัดอะดัม ที่มีส่วนช่วยเหลือในงานทดลองครั้งนี้ให้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี

ศรัณย์ รักษาพราหมณ์
วิจิตรา ตุ้งซี่
กันยายน 2560

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 การทดลอง	
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	18
วิธีการทดลอง	19
บทที่ 4 ผลการทดลองละวิจารณ์ผล	22
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	33
ประวัติผู้วิจัย	34

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. คอลลาเจนแต่ละชนิดในเนื้อเยื่อต่างๆ	10
2. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของปลิงทะเล	14
3. ปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็น และกรดอะมิโนจำเป็นของปลิงทะเล 7 ชนิด	15
4. แร่ธาตุต่าง ๆ ที่มีอยู่ในปลิงทะเล 7 ชนิด	16
5. วิตามิน, ซาโปนิน และ polysaccharides ใน *Acaudina molpadioides* และ *Thelenota ananas*	16
6. กรดอะมิโนของคอลลาเจนในสัตว์แต่ละชนิด (ส่วน ใน 1,000 ส่วน)	17
7. องค์ประกอบของกรดอะมิโนของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ (ส่วนใน 1,000 ส่วน)	25

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*)	4
2. ปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)	4
3. ลักษณะทั่วไปของปลิงทะเล	5
4. ลักษณะหนวดของปลิงทะเล: A, หนวดแบบจาน (peltate); B, หนวดแบบขนนก (pinnate); C, หนวดแบบกิ่งไม้ (dendritic); D, หนวดแบบนิ้วมือ (digitate)	5
5. ลักษณะสปีคุลของปลิงทะเล	8
6. ลักษณะแผ่นวงแหวนหินปูนของปลิงทะเล: A, Holothuriidae; B, Cucumariidae; C, D Phyllophoridae; E, Stichopodidae และ F, Synaptidae	8
7. ลักษณะเรสไปราทอรี่ทรี (respiratory tree) ของปลิงทะเล	9
8. น้ำหนักแห้งของคอลลาเจนอย่างหยาบ (Crude Collagen Fibril)	22
9. pepsin-solubilize collagen (%)	23
10. UV spectrum ของ pepsin-solubilize collagen จากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ	24
11. DSC thermogram ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ	26
12. ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำที่ pH แตกต่างกัน	26

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

คอลลาเจนเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบมากในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งพบมากถึง 20-30% ของโปรตีนที่มีทั้งหมดในร่างกาย (Harkness, 1961) โดยพบในผิวหนัง กระดูก กระดูกอ่อน เอ็น ligaments หลอดเลือด ฟัน กระจกตา และออร์แกแนลอื่นๆ ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Senaratne *et al*., 2006) จึงทำให้บางคน เรียกคอลลาเจนว่า "กาวแห่งชีวิต" เพราะทำหน้าที่เชื่อมเซลล์และอวัยวะต่างๆ ในร่างกายเข้าด้วยกัน อีกทั้งช่วยเสริมสร้างและซ่อมแซมกระดูก (Tamimi *et al*., 2008)

ในอดีตใช้คอลลาเจนที่สกัดได้จากการสกัดของหนังหมูและวัว โดยนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา การแพทย์ และเครื่องสำอาง พบว่าคอลลาเจนที่ได้จากสัตว์บกเป็นแหล่งก่อการระบาดของโรค Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นในวัว และยังส่งผลต่อคนที่รับประทานเนื้อวัวที่มีการติดเชื้อเข้า ส่งผลให้คนเป็นโรค Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) จึงได้มีความพยายามหาแหล่งคอลลาเจนใหม่จากสัตว์น้ำ เพื่อใช้ทดแทนคอลาเจนจากสัตว์บก ซึ่งได้มีรายงานการวิจัยคอลลาเจนจากสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น การสกัดคอลลาเจนจากสัตว์น้ำประเภทหอย ได้แก่ คอลลาเจนจากเนื้อหอย 2 ฝา *Mytilus galloprovinciallis*, *Septifer virgatus*, *Patinopecten yessoensis*, *Crassostrea gigas* และ *Meretrix lusoria* (Mizuta *et al*., 2004) คอลลาเจนจากปลา โดยการสกัดคอลลาเจนจากหนัง กระดูก และเกล็ดของ teleost fish, ปลา red fish ทะเลลึก (*Sebastes mentella*) (Morales *et al*., 2000; Wang *et al*., 2007) คอลลาเจนจากหนังปลากระเบน หนังปลาเฉา (*Ctenopharyngodon idella*) หนังปลาปักเป้า (brown back toadfish) หนังปลา Pollock (*Theragra chalcogramma*) (Sadowska *et al*., 2003; Zhang *et al*., 2007; Senaratne *et al*., 2006; Yan *et al*., 2008) คอลลลาเจนจากหนวดหมึก (Nagai *et al*., 2001) คอลลาเจนจากกุ้ง และปูทะเล (*Scylla serrata*) (Yoshinaka *et al*., 1990; Sivakumar *et al*., 2000) คอลลาเจนจากหอยเม่น (sea urchin) (Robinson, 1997; Cluzel *et al*., 2000) และคอลลาเจนจากปลิงทะเล (Trotter *et al*., 1995; Saito *et al*., 2002; Cui *et al*., 2007) มีรายงานการศึกษาคุณสมบัติของคอลลาเจน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม พบว่าใช้คอลลาเจนเป็น carrier สำหรับการขนส่งยา (drug delivery) ช่วยเสริมสร้างและซ่อมแซมกระดูก (Tamimi *et al*., 2008) ผ้าปิดแผล (Li *et al*., 2005) เป็นต้น จากคุณสมบัติการอุ้มน้ำที่ดีของคอลลาเจนจึงนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางโดยใช้เป็น moisturizing ในการรักษาความชุ่มชื้น (Swatschek *et al*., 2002) คอลลาเจนที่ถูกความร้อนจะมีคุณสมบัติเป็นเจลาติน จึงนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และการห่อหุ้มผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อ (ไส้กรอก ไส้

กรอกอิตาเลี่ยน snack sticks) เป็นต้น (Senaratne *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมกาว อุตสาหกรรมเครื่องหนังและฟิล์ม (Kittiphattanabawon *et al*., 2005)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้พยายามหาแหล่งคอลลาเจนจากสัตว์ทะเลชนิดใหม่ เพื่อมาทดแทนคอลลาเจนที่สกัดจากวัว ซึ่งมีความเสี่ยงและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) ในคน โดยทำการสกัดและตรวจสอบคุณลักษณะเบื้องต้นของคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเล เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต ซึ่งปลิงทะเลเป็นสัตว์ทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่น่าสนใจในการนำมาสกัดคอลลาเจน และสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ปลิงทะเลชนิดต่างๆ ในประเทศไทยได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้
2. เพื่อศึกษากรดอะมิโนของคอลลาเจนที่สกัดได้
3. เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพโดยหาอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพได้
4. เพื่อทดสอบความสามารถในการละลายของคอลลาเจนที่สกัดได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวารสาร และสามารถนำผลที่ได้จากการวิจัยไปใช้ประยุกต์ใช้ทางด้านอาหารและเภสัชกรรม

ขอบเขตของโครงการวิจัย

รวบรวมปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) จากธรรมชาติในทะเลฝั่งอันดามันบริเวณเกาะปู อ. เหนือคลอง จ. กระบี่ ห่างจากฝั่งประมาณ 10-15 กิโลเมตร น้ำลึกประมาณ 1-2 เมตร คัดเลือกเฉพาะปลิงที่มีสุขภาพดี จากนั้นทำการสกัดคอลลาเจนจากผนังลำตัวของปลิงทะเลขาว ศึกษาการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้ ศึกษากรดอะมิโน อุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพ และความสามารถในการละลายของคอลลาเจนที่สกัดได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. อนุกรมวิธานของปลิงทะเล

ลำดับอนุกรมวิธานของปลิงทะเล

Phylum Echinodermat

Class Holothuroidea (with tube feet)

Order Aspidochirotida (with tentacles peltate)

Family Holothuriidae (with body usually circular and gonads single)

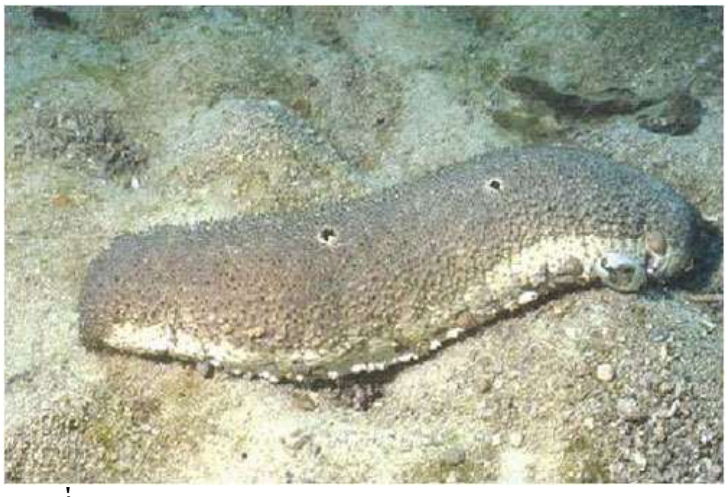
Genus *Holothuria* (*Metriatyla*) Rowe, 1969

Species *Holothuria* (*Metriatyla*) *scabra* Jaeger, 1833

Holothuria (*Mertensiothuria*) *leucospilota* Brandt, 1835

2. รูปร่างและลักษณะทางชีววิทยาของปลิงทะเล

ปลิงทะเลมีลักษณะผิวของลำตัวที่มีทั้งหนา บาง โปร่งแสง และทึบแสง แล้วแต่ชนิด ในปลิงทะเลขาว จะมีผิวลำตัวสีดำ เทา หรือน้ำตาล ส่วนผิวด้านท้องจะเป็นสีขาว (ภาพที่ 1) และในปลิงทะเลดำจะมีสีดำทั้งลำตัว (ภาพที่ 2) ร่างกายมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกยาว มีแกนสมมาตรในแนวรัศมี ลำตัวอ่อนนุ่มและมีเส้นแนวพาดตามลำตัวตั้งแต่ปากไปเกือบถึงทวารหนัก ด้านท้อง (ventral side) แนบติดพื้น มีสีซีด มีแถบแอมบูลาครัม (ambulacrum) 3 แถบสลับกับอินเตอร์แอมบูลาครัม (interambulacrum) 2 แถบ เรียกว่า ไตรเวียม (trivium) (ภาพที่ 3) บริเวณด้านหลัง (dorsal side) นูนขึ้นมีสีเข้มและมีแถบแอมบูลาครัม 2 แถบ สลับกับแถบอินเตอร์แอมบูลาครัม 3 แถบ เรียกว่า ไบเวียม (bivium) โพเดีย (podia) ทางด้านท้องเจริญดีกว่าด้านหลังและมีแว่นดูด เรียกว่า เท้าท่อ (tube feet) ในปลิงทะเลบางกลุ่มอาจไม่มีเท้าท่อ โพเดียอาจพบทางด้านหลัง แต่มีจำนวนน้อยมากและมีขนาดเล็ก โพเดียทำหน้าที่ในการรับสัมผัส มีตำแหน่งอยู่ในแถบแอมบูลาครา แต่ปลิงทะเลหลายชนิดมีโพเดียกระจายออกอย่างไม่มีระเบียบ ลักษณะลำตัวแบบนี้จะเป็นสมมาตรของซีกซ้ายขวา (จรัสศรี และคณะ, 2551)

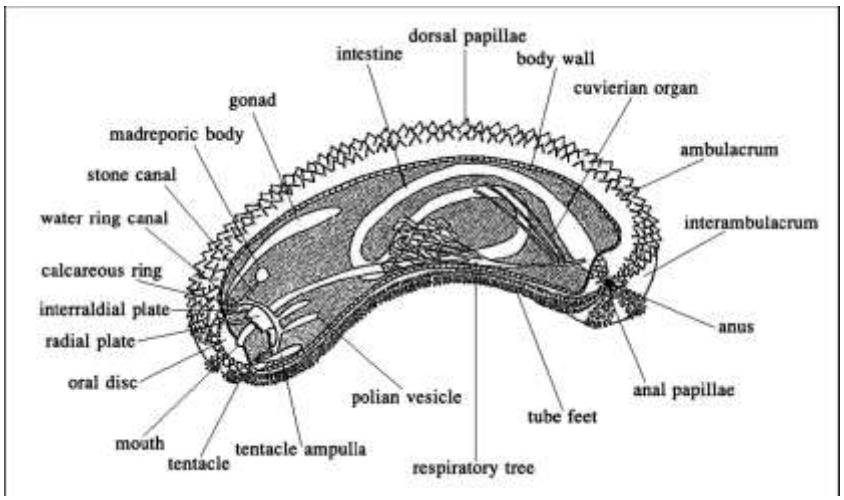


ภาพที่ 1. ปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*)

ที่มา: อารมณ์ (2558)

ภาพที่ 2. ปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

ที่มา: Keng (2013)



ภาพที่ 3. ลักษณะทั่วไปของปลิงทะเล

ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)

ด้านหน้าของลำตัวมีช่องปากซึ่งมีหนวดอยู่รอบๆ ปาก และปลิงทะเลเกือบทุกชนิดมีหนวดที่เห็นได้ชัดเจนเป็นวงรอบปาก (buccal tentacle) หนวดเปลี่ยนแปลงมาจากโพเดียรอบปาก ซึ่งมักจะมี 10–30 เส้น หน้าที่หลักของหนวด คือ รวบรวมอาหาร หนวดจะมีลักษณะไม่ซับซ้อนแต่มีหลายแบบ คือ งอกออกมาคล้ายนิ้วมือ (digitate) หรือแตกแขนงแบบกิ่งก้านหรือกิ่งไม้ (dendritic) หรือแบบขนนก (pinnate) หรือแขนงที่แตกออกมีก้านสั้นปลายแขนงเป็นแว่นทรงกลมหรือแบบจาน (peltate) (ภาพที่ 4) ผนังของหนวดมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันน้อยและกล้ามเนื้อเจริญดี เมื่อหนวดหดตัวผนังตัวจะยื่นออกมาคลุมเพื่อป้องกันหนวด บริเวณปากของปลิงทะเลจะมีสีที่เด่นชัด

ผนังตัวของปลิงทะเลจะมีเดอร์มิส (dermis) เป็นเยื่อเกี่ยวพันที่หนาและยืดหยุ่นได้ดี ในเดอร์มิส ประกอบด้วย ออสซิเคิลหรือสปิคูล (ภาพที่ 5) ฝังตัวอยู่ในผนังกล้ามเนื้อ ขนาดเล็กมากรูปร่างต่างๆ กัน ซึ่งมีความสำคัญในการจำแนกชนิดและการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน บริเวณปากมีแผ่นวงแหวนหินปูน (calcareous ring) (ภาพที่ 6) ทวารหนัก (anus) อยู่ส่วนท้ายของลำตัว

ภาพที่ 4. ลักษณะหนวดของปลิงทะเล: A, หนวดแบบจาน (peltate); B, หนวดแบบขนนก (pinnate); C, หนวดแบบกิ่งไม้ (dendritic); D, หนวดแบบนิ้วมือ (digitate)

ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)

ทางเดินอาหารผันแปรตามลักษณะของตัวปลิงทะเลและอุปนิสัยการกินอาหาร แต่โดยทั่วไปจะประกอบด้วย 4–5 บริเวณ มีคอหอย (pharynx) สั้นต่อกับแคปซูลของอุ้งปาก (buccal capsule) ซึ่งค้ำจุนด้วยวงของออสซิเคิลขนาดใหญ่ แคปซูลของอุ้งปากเป็นส่วนที่สำคัญมาก เนื่องจากเป็นที่อยู่ของท่อวงแหวนของระบบท่อน้ำและวงแหวนของระบบประสาท แถบกล้ามเนื้อตามยาวของผนังตัวที่มาถึงบริเวณใกล้กับปากจะแตกแขนงเป็นกล้ามเนื้อในการหดตัวไปเกาะที่แคปซูลของอุ้งปาก ใช้ในการดึงปากและหนวดให้หดตัวลงมาชั่วคราว ถัดมาจะเป็นหลอดอาหาร

การหมุนเวียนของของเหลวเกิดภายในช่องลำตัว (coelom) ขนาดใหญ่ เยื่อบุผนังช่องลำตัวชนิดมีขน (ciliated epithelium) มีประโยชน์ช่วยในการพัดโบกให้เกิดกระแสของเหลวไหลวนเวียนอยู่ภายใน ช่วยลำเลียงอาหารให้แก่อวัยวะต่างๆ ภายในช่องลำตัวมีเซลล์ซีโลโมไซท์ (coelomocyte) จำนวนมากหลายรูปแบบตามหน้าที่ เช่น ซีโลโมไซท์ที่ทำหน้าที่จับอาหาร เรียกว่า ฟาโกไซติกอะมีโบไซท์ (phagocytic amoebocyte) ลักษณะไม่มีสีและมีขนาดเล็กมาก ส่วนซีโลโมไซท์ที่ทำหน้าที่ลำเลียงก๊าซ เรียกว่า ฮีโมไซท์ (hemocyte) ลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง ถ้าอยู่รวมกันเป็นจำนวนมากจะทำให้ของเหลวมีสีแดง (จรัสศรี และคณะ, 2551)

ปลิงทะเลมีการแลกเปลี่ยนก๊าซบริเวณผนังตัวที่บาง เช่น หนวดรอบปากและเท้าท่อ อวัยวะที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนก๊าซของปลิงทะเล มีลักษณะเป็นท่อแตกแขนงออกจากโคลเอกา (cloaca) คล้ายต้นพืช เรียกว่า เรสไปราทอรี่ทรี (respiratory tree) (ภาพที่ 7) อยู่สองข้างทางของทางเดินอาหาร ปลิงทะเลอันดับApodida จะไม่มีเรสไปราทอรี่ทรี แต่แลกเปลี่ยนก๊าซทางผิวหนังโดยตรง (จรัสศรี และคณะ, 2551)

ระบบท่อน้ำประกอบด้วยท่อที่ให้ของเหลวจากช่องตัวไหลเวียนอยู่ภายใน เพื่อเป็นแรงอัดดันให้เท้าท่อเหยียดออกขณะเคลื่อนที่ สามารถแบ่งออกเป็นส่วนๆ คือ แผ่นตะแกรง (madreporite) สำหรับกรองน้ำ ที่จะเข้าสู่ท่อระบบหมุนเวียนน้ำ ท่อหลังแผ่นตะแกรง (stone canal) ท่อแหวน (ring canal) ตั้งอยู่รอบคอหอย โพเลียนเวสิเคิล (polian vesicle) ค่อนข้างยาวต่อจากท่อวงแหวน ทำหน้าที่ช่วยปรับความดันภายในระบบท่อน้ำนี้ให้คงที่ โดยการพองตัวและหดตัว ท่อรัศมี (radial canal) แยกจากท่อวงแหวนในแนวรัศมีฝังอยู่ใกล้ผิวตัว ท่อย่อยที่แยกจากท่อรัศมีออกมาสองข้าง (lateral canal) ท่อเล็กเหล่านี้จะไปสิ้นสุดที่เท้าท่อ ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนที่โผล่ยื่นออกมาพ้นผิวหนัง มีลักษณะเป็นปุ่มสั้นๆ ที่ปลายด้านในของหลอดเท้าและพองออกเป็นกระเปาะ (ampulla) เมื่อกล้ามเนื้อที่ผนังของกระเปาะนี้หดตัว ของเหลวภายในจะดันให้หลอดเท้าหรือหนวดเหยียดตัวยาวออก ในกลุ่มของปลิงทะเลที่ไม่มีเท้าท่อระบบท่อน้ำจะเหลืออยู่เพียงท่อวงแหวนและโพเลียนเวสิเคิลพันอยู่รอบคอหอยกับบักเคิลโพเดีย (buccal podia) หรือหนวด (จรัสศรี และคณะ, 2551)

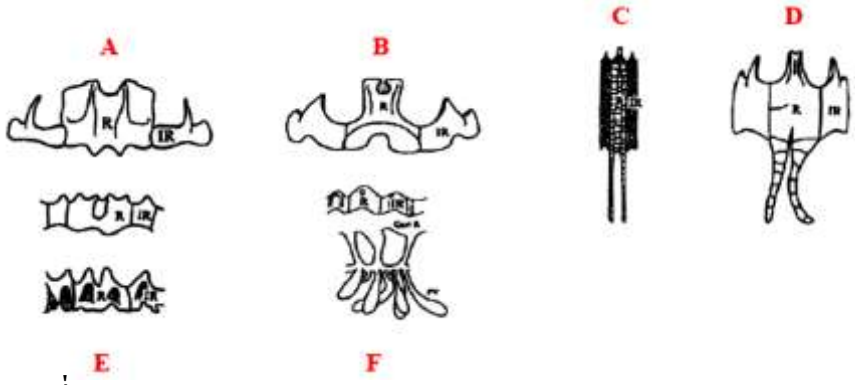
ปลิงทะเลส่วนใหญ่จะอาศัยบนพื้นท้องทะเล เวลาที่ต้องการเคลื่อนที่ (locomotion) จะใช้เท้าท่อสำหรับในกลุ่มที่ไม่มีเท้าท่อ ซึ่งได้แก่ ปลิงทะเลออร์เดอร์ Apodida จะอาศัยการยืดหดของผนังลำตัวร่วมกับการใช้สปิคุลรูปสมอเกาะไปตามพื้น ปลิงทะเลบางชนิด เช่น ปลิงทะเลดำ

(*Holothuria leucospilota*) มีท่อปิดยาวเรียวงอกออกมาจากท่อหลักของเรสไปราทอรี่ทรี เรียกว่า ท่อคูเวียร์ (tubes of cuvier) ใช้ในการป้องกันตัว โดยการหดกล้ามเนื้อของผนังลำตัวอย่างรุนแรงทำให้ผนังด้านหลังของท่ออาหารตอนท้ายฉีกออกและเกิดแรงดัน ทำให้ของเหลวในซีลอมไหลเข้าสู่ท่อทางเดินอาหารตอนท้ายและออกไปทางทวารหนัก โดยมีท่อคูเวียร์ติดออกไปด้วยและแปรสภาพเป็นสารเหนียวคล้ายสายไหมที่ยาวและขาดง่าย เมื่อศัตรูถูกคลุมด้วยท่อคูเวียร์จะเคลื่อนที่ช้าลง ปลิงทะเลอาจมีการปกป้องตัวเองในลักษณะอื่นๆ เช่น สร้างสารพิษหุ้มตัวหรือปล่อยสารรบกวน (repellent substance) ทำให้ปลาผละหนีไป ปลิงทะเลจะขับอวัยวะภายใน (autoevisceration) เมื่อต้องประสบกับภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ช่วงของอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป น้ำเสีย หรือมีการเปลี่ยนแปลงทางฟิสิกส์และเคมีอย่างรวดเร็ว ปลิงทะเลหลายชนิดจะขับอวัยวะภายในออกทางช่องทวารหนัก จากนั้นผนังลำตัวของปลิงทะเลจะแข็งขึ้น โดยอวัยวะภายในจะสามารถงอกใหม่ (regeneration) ได้อย่างรวดเร็วปลิงทะเลมีอวัยวะสืบพันธุ์เพียงอันเดียว (single gonad) บางชนิดมีเพศแยก (dioecious) บางชนิดมีเพศรวม (hermaphrodite) แต่ส่วนใหญ่จะมีเพศแยก อวัยวะสืบพันธุ์รวมมีเพียง 1 ชุด ต่อมสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีแขนงเป็นพูเรียวยาวหลายพู มีท่อไปยังรูสืบพันธุ์ที่อยู่ระหว่างหนวด 1 คู่ ทางด้านหลังของลำตัว ส่วนพวกที่มีเพศรวมมีอวัยวะสืบพันธุ์อันเดียวสร้างทั้งรังไข่และสเปิร์มผสมภายในตัวโดยสร้างไข่ขึ้นก่อน ปลิงทะเลอาศัยอยู่ในเขตน้ำตื้นจนถึงทะเลลึก ดำรงชีวิตเป็นสัตว์หน้าดินทั้งหมด สามารถที่จะปรับตัวให้ดำรงชีวิตในแหล่งที่อยู่ได้หลายแบบ จากการศึกษาลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัยและการกินอาหารของปลิงทะเล พบว่าปลิงทะเลมีรูปแบบการกินอาหาร 2 แบบ คือ กินอาหารที่แขวนลอยในมวลน้ำ และกินอาหารที่ตกอยู่บนพื้นหรือปนอยู่กับตะกอน ปลิงทะเลออร์เดอร์ Aspidochirotida อาศัยในแนวปะการังหรือนอกแนวปะการัง หาอาหารโดยใช้หนวดจับตะกอนหรืออินทรียสารต่างๆ ตามพื้นดิน ปลิงทะเลออร์เดอร์ Dendrochirotida อาศัยอยู่ในแนวปะการัง โดยเกาะอยู่กับวัตถุหรือฝังตัวตามพื้นทราย ใช้หนวดจับตะกอนหรือแพลงก์ตอนที่ล่องลอยมากับมวลน้ำ และปลิงทะเลออร์เดอร์ Apodida อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำหรือปะการัง โดยจะดักจับตะกอนที่ติดอยู่ตามผนังตัวของฟองน้ำหรือปะการังเป็นอาหาร ระบบประสาทของปลิงทะเลยังไม่เจริญมากนัก ประกอบด้วยประสาทรูปวงแหวนล้อมรอบอุ้งปากใต้ฐานของหนวด จากวงแหวนนี้จะมีเส้นประสาทแยกออกไปยังอวัยวะใกล้เคียงเป็นเส้นสั้นๆ ส่วนเส้นประสาทยาววิ่งไปตามแนวรัศมีฝังอยู่ในชั้นผิวตัวหรือเดอร์มิส เส้นประสาทนี้ยาวตลอดลำตัวและยังมีแขนงประสาทแยกออกมาจับตัวเป็นกลุ่มอยู่ใต้ผิวหนังชั้นนอก ปลิงทะเลรับความรู้สึกและแสดงอาการตอบโต้ช้ามากเนื่องจากอวัยวะรับความรู้สึกยังไม่เจริญ เซลล์รับความรู้สึกจะกระจายอยู่ตามผิวตัวทั่วไปโดยจะจับกลุ่มหนาแน่นเฉพาะแห่ง และมีมากที่บริเวณส่วนปลายหัวท้ายลำตัว ที่ตุ่มตามผิวและที่หนวด ปลิงทะเลบางชนิดมีอวัยวะรับแสงอยู่ที่โคนหนวด ปลิงทะเลออร์เดอร์ Apodida มีอวัยวะเกี่ยวกับการทรงตัว (statocyst) เจริญดี ปลิงทะเลจะอาศัยอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่ม แหล่งที่อยู่ของปลิงทะเลมีหลายรูปแบบ ปลิงทะเลบางชนิดสามารถอาศัยอยู่ในแหล่งที่อยู่ได้หลาย

รูปแบบ เช่น *Cucumaria curata* พบใน 3 แหล่งที่อยู่บริเวณชายฝั่งของแคลิฟอร์เนีย คือ แหล่งที่อยู่แรกจะพบนอนนิ่งๆ บริเวณชายหาดอย่างหนาแน่น แหล่งที่อยู่ที่สองจะพบรวมกันเป็นกลุ่มๆ ละ 5–20 ตัว ในบริเวณที่มีการเลี้ยงหอย (*Mytilus* bed) และแหล่งที่อยู่ที่สามจะอาศัยรวมตัวกันอยู่ใต้ก้อนหินซึ่งอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำขึ้นน้ำลง (midlittoral zone) (จรัสศรี และคณะ, 2551)

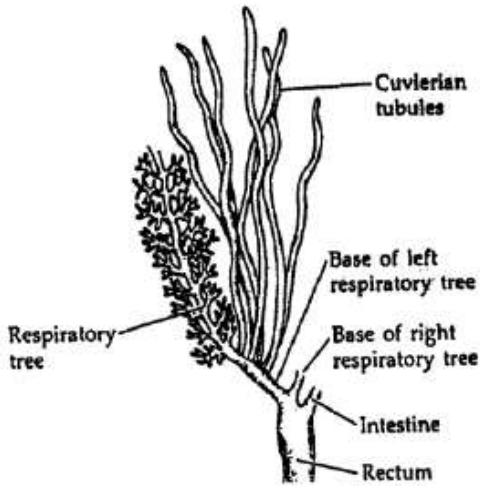
ภาพที่ 5. ลักษณะสปิคุลของปลิงทะเล

ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)



ภาพที่ 6. ลักษณะแผ่นวงแหวนหินปูนของปลิงทะเล: A, Holothuriidae; B, Cucumariidae; C, D; Phyllophoridae; E, Stichopodidae และ F, Synaptidae

ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)



ภาพที่ 7. ลักษณะเรสไปราทอรี่ทรี (respiratory tree) ของปลิงทะเล

ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)

3. องค์ประกอบและโครงสร้างของคอลลาเจน

คอลลาเจน (collagen) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก คือ Kolla ซึ่งแปลว่ากาว (Nuchzzii, 2007) คอลลาเจนเป็นโปรตีนธรรมชาติที่สำคัญของเนื้อเยื่อยึดเหนี่ยว (connective tissue) ได้แก่ ผิวหนัง เอ็น กระดูก กระดูกอ่อน หลอดเลือด และเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นโปรตีนที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายประมาณร้อยละ 6 ของน้ำหนักตัว หรือประมาณ 1 ใน 3 ของโปรตีนทั้งหมดที่มีในร่างกาย โดยจะอยู่ภายใต้ผิวหนังชั้นหนังแท้ (Dermis) เลือดคอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใยยาว (Fibrous protein) มีโครงรูปของสายเปปไทด์ที่เป็นเส้นใยยาว ไม่ละลายน้ำ และทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง ซึ่งทำหน้าที่แตกต่างไปจากโปรตีนที่มีรูปร่างกลม (globular protein) เช่น เอนไซม์ นอกจากนั้นคอลลาเจนมีลักษณะเหนียว มีแรงต้านแรงดึงสูงมาก เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของผิวหนัง ทำให้หลอดเลือดแข็งตัว และมีบทบาทต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาพบคอลลาเจนมากกว่า 25 ชนิด แต่ละชนิดมีรหัสยีนที่แตกต่างกัน โดยหลักการคอลลาเจนมีได้มากกว่า 10,000 ชนิด แต่คอลลาเจนที่พิสูจน์ทราบแล้วมีเพียง 25 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งคอลลาเจนที่พบมากที่สุด ได้แก่ คอลลาเจน Type I, II, III และ IV (Prockop and Kivirikko, 1995) ซึ่งคอลลาเจน Type II และ III จะเป็นคอลลาเจนชนิด homotrimer มีสายเปปไทด์ 3 สายของ α_1(II) หรือ α_1 (III) ขณะที่ Type I เป็น heterotrimer [$(\alpha_1)_2$ α_2] (Piez *et al*., 1963) คือประกอบด้วย α_1(I) 2 สาย และ α_2(I) 1 สาย หรือ ประกอบด้วยสายเปปไทด์ต่างกันทั้งสามสาย คือ [(α1) (α2) (α3)] (Piez, 1965; Francois and Glincher, 1967) คอลลาเจนเกิดขึ้นได้จากหน่วยย่อยโทรโพคอลลาเจน (tropocollagen subunit) มีลักษณะเหมือนหลอดยาวประมาณ 300 นาโน

เมตร และเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 นาโนเมตร ประกอบขึ้นด้วยสายโพลีเปปไทด์ 3 สาย แต่ละสายโพลีเปปไทด์เป็นสายเกลียววนซ้าย และเมื่อสามสายโพลีเปปไทด์รวมเข้าด้วยกันจะบิดเป็นเกลียวเหมือนขดเลือดวนขวา น้ำหนักโมเลกุลของสายเกลียวทั้งสามสายประมาณ 300,000 ดาลตัน แต่ละสายของสายเกลียว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน (Lehninger, 1971) โครงสร้างของคอลลาเจนจะคงตัวด้วยพันธะไฮโดรเจนจำนวนมาก และสายเกลียวทั้งสามสายยังเกิดพันธะโควาเลนท์ พันกันไปมาระหว่างสาย พบว่าระหว่างหน่วยย่อยด้วยกันทำให้เกิดคอลลาเจนชนิดต่างๆ ที่พบในเนื้อเยื่อที่เจริญเต็มที่แล้ว

ตารางที่ 1 คอลลาเจนแต่ละชนิดในเนื้อเยื่อต่างๆ

ชนิดของคอลลาเจน	แหล่งที่พบ
Type I	พบมากที่สุด ซึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น กระดูก ผิวหนัง เอ็น และเส้นเลือด
Type II	เส้นเลือดและแก้วตา
Type III	เส้นเลือด
Type IV	เนื้อเยื่อแผ่นบางๆ ที่อยู่นอกเซลล์ โดยอยู่ใต้เนื้อเยื่อบุผิว
Type V	กระดูก กระจกตา และเนื้อเยื่อระหว่างเซลล์
Type VI	ตับ ไต และรอบๆ กระดูกอ่อน
Type VII	จุดเชื่อมต่อในผิวหนังกำพร้า หรือผิวหนังชั้นใน
Type VIII	เซลล์บุเส้นเลือด
Type IX	เส้นเอ็น
Type X	การขยายตัวของเนื้อเยื่อและเปลี่ยนเป็นแร่ธาตุในเส้นเอ็น
Type XI	เส้นเอ็น
Type XII	กระดูกและเส้นใยที่เกี่ยวพันกับคอลลาเจน
Type XIII	หนังกำพร้า ต่อมผม และรากเล็บ
Type XIV	เหมือนกับ Type I
Type XV	อยู่ในเนื้อเยื่อจำนวนมาก และมีแหล่งกำเนิดเดียวกับ Type XVIII
Type XVI	อยู่ภายใต้การศึกษา
Type XVII	บริเวณที่ยึดของลำไส้เล็กตอนปลายและหนัง
Type XVIII	ไต และตับ
Type XIX	ตา สมอง อัณฑะ และเนื้อเยื่อใน embryo
Type XX-XXV	ยังไม่ทราบ

ที่มา: Olsen และคณะ (2003)

โครงสร้างที่เป็นสายเกลียวทั้งสามสายยึดกันแน่นโดยมีการจัดเรียงกรดอะมิโนในแต่ละสายเกลียวของหน่วยย่อยคอลลาเจนเป็นลักษณะพิเศษ คือ ลำดับของกรดอะมิโนมักเป็น Gly-X-Pro หรือ Gly-X-Hypro (Gly = ไกลซีน Pro = โพรลีน Hypro = ไฮดรอกซีโพรลีน และ X = กรดอะมิโนอื่นๆ) นอกจากนี้ยังพบการเรียงของกรดอะมิโนแบบ Gly-Pro-Hypro ซึ่งโครงสร้างที่มีหน่วยซ้ำๆ กันแบบนี้ เรียกว่า repeating amino acids โดยส่วนใหญ่คอลลาเจนประกอบด้วยไกลซีน 33% อะลานีน 11% โพรลีน 12% ไฮดรอกซีโพรลีน 11% และยังมี ไฮดรอกซีไลซีน ซึ่งกรดอะมิโนสองตัวหลังเกิดขึ้นหลังการสังเคราะห์โปรตีนเสร็จ โดยมีการเติมกลุ่ม –OH เข้าไป ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ และต้องใช้วิตามินซีด้วย (มนตรี และคณะ, 2542) การที่มีไกลซีนสูง และรูปแบบการจัดเรียงซ้ำๆ จะไม่พบในโปรตีนรูปกลม (globular protein) แต่พบได้ในโปรตีนเส้นใย (fibrous protein)

ไกลซีนเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุด จึงมีบทบาทเด่นในโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใย ซึ่งในคอลลาเจนพบไกลซีนอยู่ในทุกตำแหน่งที่สาม สายเกลียวทั้งสามสายจะเก็บส่วนไกลซีนไว้ด้านใน (แกน) ของสายเกลียว เนื่องจากพื้นที่จำกัดและไกลซีนมีขนาดเล็กมากที่สุด และส่งผลให้คอลลาเจนไม่ยืด ส่วนวงแหวนของโพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน จะชี้ออกจากสายเกลียว กรดอะมิโนทั้งสองนี้ช่วยให้หน่วยย่อยโทรโพคอลลาเจนเสถียรต่อความร้อน (Myllyharju, 2005)

คอลลาเจนที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น ในกระดูกจะมีโครงสร้างของสายเกลียวสามเส้นที่วางซ้อนกันเป็นแถวหลวมๆ ช่องว่างระหว่างปลายของหน่วยย่อยโทรโพคอลลาเจนอยู่ห่างกัน 40 นาโนเมตร ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นใจกลาง (นิวเคลียส) สำหรับผลึกของเกลือแร่ซึ่งมีลักษณะละเอียดแข็งและยาว มาจับได้แก่ ผลึก ไฮดรอกซีอะพาไทต์ [$Ca_5(PO_4)_3(OH)$] ที่มีฟอสเฟตอยู่ และคอลลาเจนให้ความยืดหยุ่นแก่กระดูก จึงมีส่วนช่วยป้องกันกระดูกแตก (Moskowitz, 2000)

4. คอลลาเจนจากวัว

คอลลาเจนจากวัวเป็นที่นิยมใช้ โดยสามารถสกัดได้จากบริเวณผิวหนัง เอ็น กระดูกและกล้ามเนื้อ แต่ออร์แกนต่างๆ ที่ได้จากวัวจะเสี่ยงต่อการเกิดโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy; BSE) หรือ Mad Cow Disease

โรควัวบ้า Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) เป็นโรคที่เกิดขึ้นกับระบบประสาทของวัว เกิดจากสารโปรตีนตัวหนึ่งที่เรียกว่า prion โดยเกิดระบาดในประเทศอังกฤษเมื่อปี 1986 พบวัวเสียชีวิตจากโรคนี้จำนวน 168,000 ตัว ซึ่งเกิดจากวัวเหล่านี้ได้รับเนื้อและกระดูกป่นจากแพะที่ตายจากโรค scrapie-containing sheep ซึ่งมีสาร prion ปนเปื้อนอยู่ (วิลัยภรณ์, 2550)

สำหรับในคน มีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2463 โดยนายแพทย์ครอยเฟลด์ท (Creutzfeldt) และนายแพทย์จาคอบ (Jacop) จึงเรียกชื่อโรคนี้ว่า Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) (นิรนาม, 2544) หรือสมองฝ่อ พบได้ไม่บ่อย แต่เมื่อเป็นแล้วเสียชีวิตทุกราย อาการเริ่มต้นจาก

ความจำเสื่อม พฤติกรรมเปลี่ยนไป เครียด มีปัญหาเกี่ยวกับการมองเห็น มีอาการสับสน ไม่สามารถควบคุมการเคลื่อนไหว ตาบอด กล้ามเนื้ออ่อนแรง และเสียชีวิต พบประมาณ 1 คนใน 1,000,000 คน และพบว่าในส่วนของสมองมีรูพรุนเหมือนฟองน้ำ ที่บริเวณ basal ganglia cerebellum และ thalamus นอกจากประเทศอังกฤษแล้วยังพบโรควัวบ้าที่ประเทศฝรั่งเศส โปรตุเกส สวิตเซอร์แลนด์ สาธารณรัฐไอร์แลนด์ โอมาน อิตาลี เดนมาร์ก แคนาดา เยอรมัน (วิชัย, 2551)

โรคนี้เกิดจากสารโปรตีน ไม่ใช่เชื้อโรค และติดต่อกันทางอาหารการกิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกินเนื้อวัว ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงอาหารเสริมความจำที่ทำจากสมองวัวสดและการสกัดจากต่อมของวัว นอกจากจะไม่เสริมความจำแล้ว อาจทำให้สมองเสื่อมตลอดไป (นริศ, 2544)

5. คอลลาเจนจากสัตว์น้ำ

คอลลาเจนจากสัตว์น้ำเป็นแหล่งคอลลาเจนแหล่งใหม่ ที่ใช้ทดแทนคอลลาเจนจากสัตว์บก อดีตใช้คอลลาเจนที่ได้จากการสกัดของหมูและวัวในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งคอลลาเจนจากวัวมีโอกาสทำให้เกิดโรค Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) ในคน ดังนั้นนักวิจัยจึงได้ทำการสกัดคอลลาเจนจากสัตว์น้ำมากมายหลายชนิด เช่น การสกัดคอลลาเจนจากปลา ได้แก่ การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา skate (*Raja kenojei*), codfish, brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*), *Sebastes mentella*, *Theragra chalcogramma*, *Ctenopharyngodon idella* คอลลาเจนจากหนังและกล้ามเนื้อของปลา catfish เป็นต้น (Hwang *et al*., 2007; Sadowska *et al*., 2003; Seneratne *et al*., 2006; Wang *et al*., 2007; Yan *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2007; Liu *et al*., 2007; Sivakumar *et al*., 2000) นอกจากนั้นยังพบการสกัดคอลลาเจนจากสัตว์น้ำประเภทหอย ได้แก่ คอลลาเจนจากเนื้อหอย 2 ฝา *Mytilus galloprovinciallis*, *Septifer virgatus*, *Patinopecten yessoensis*, *Crassostrea gigas* และ *Meretrix lusoria* คอลลาเจนจาก mantle และ adductor จาก peal oyster (*Pinctada fucata*) (Mizuta *et al*., 2004) คอลลาเจนจาก mantle ของ scallop (Shen *et al*., 2007) คอลลลาเจนจากหนวดหมึก (Nagai *et al*., 2001) คอลลาเจนจากกุ้ง และปูทะเล (*Scylla serrata*) (Yoshinaka *et al*., 1990; Sivakumar *et al*., 2000) คอลลาเจนจากหอยเม่น (sea urchin) (Robinson, 1997; Cluzel *et al*., 2000) และมีการสกัดคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิด *Cucumaria frondosa* ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Trotter *et al*., 1995) และชนิด *Stichopus japonicus* ในประเทศจีน (Cui *et al*., 2007)

วิธีการสกัดคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ มี 2 วิธีด้วยกัน คือ 1) สกัดด้วย acetic acid (acid-soluble collagen; ASC) ซึ่งทำการสกัด 1 ครั้งหรือ 2 ครั้ง และ 2) สกัดด้วย pepsin (pepsin-soluble collagen; PSC) โดยนำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วย acetic acid มาสกัดซ้ำด้วย pepsin หรือทำการสกัดโดยใส่ acetic acid พร้อมกับ pepsin (Wang *et al*., 2007; Yan *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2007; Liu *et al*., 2007)

ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากสัตว์น้ำ มีความแตกต่างกันในสัตว์น้ำแต่ละชนิด เช่น ในหนังปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctaus*) พบคอลลาเจน 64.2% และ 54.3%, 47.5% และ 46.6% ในหนังปลา *Lagocephalus gloveri*, *Sebastes mentella* และ *Ctenopharyngodon idella* ตามลำดับ (Liu *et al*., 2007; Seneratne *et al*., 2006; Wang *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2007) และพบว่าคอลลาเจนจากสัตว์น้ำมีสาย α เหมือนกับคอลลาเจนจากหมูและวัว คือ ประกอบไปด้วยสาย α_1 และ α_2 ขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนสาย α จากสัตว์น้ำอยู่ในช่วง 100-150 kDa นอกจากนั้นยังพบสายบีตาและสายแกมมาที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 200 และมากกว่า 200 kDa (Liu *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2007; Yan *et al*., 2008; Seneratne *et al*., 2006; Wang *et al*., 2007)

6. **ประโยชน์ของปลิงทะเล**

จากบันทึกประวัติศาสตร์ของจีน มีการใช้ปลิงทะเลครั้งแรกเพื่อนำมาทำอาหารเพราะปลิงทะเลมีคุณค่าทางโภชนาการ (ตารางที่ 2, 3, 4 และ 5) และมีคุณสมบัติเป็นยา โดยปลิงทะเลแห้งจะมีปริมาณโปรตีนสูงมาก ประมาณ 55-70% ความชื้น 70-80% และมีไขมันน้อยมาก และพบว่าการกินปลิงทะเล เป็นประเพณีของชาวจีน ซึ่งสามารถย้อนไปถึงจารึกประเพณีของราชวงศ์ Ming (1368-1684) โดยพบว่าชาวจีนจะกินปลิงทะเลเป็นยาบำรุงมากกว่าการลิ้มรสปลิงทะเล (Chen, 2003; Lovatelli *et al*., 2004) ขณะที่ Conand และ Byrne (1993) อ้างจาก Toral-Granda และคณะ (2008) พบว่ามีการบริโภคแบบดั้งเดิมในเกาะ Papua New Guinea, เกาะ Samoa และเกาะ Fiji ซึ่งปลิงทะเลบางชนิดที่มีประโยชน์ทางการค้า (*Stichopus horrens* และ *S. herrmanni*) จะนำมาทำเป็นผลผลิตยา แต่นำมาทำอาหารน้อยกว่า พบว่าในมาเลเซียจะนำทั้ง 2 ชนิด มาใช้ในการเตรียมยาแบบดั้งเดิม ชนิดที่นำมาใช้โดยทั่วไปจะอยู่ในวงศ์ Holothuroidea และ Stichopodidae

อารมณ์ (2558) รายงานว่า ปลิงทะเลมีคุณค่าประโยชน์มากมายโดยนักวิทยาศาสตร์ค้นพบว่า เนื้อของปลิงทะเลอุดมไปด้วยสารอาหารที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกายมนุษย์ โดยเฉพาะมิวโคโปรตีน (mucoprotien) ซึ่งในมิวโคโปรตีนนี้ มีคอนดรอยตินซัลฟุริคแอซิค (chondroitin sulfuric acid) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ คอนดรอย ตินซัลฟุริคแอซิค เป็นองค์ประกอบของส่วนต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของกระดูกอ่อน เอ็น และสารหล่อลื่นตามข้อของมนุษย์ ดังนั้น การรับประทานปลิงทะเลจึงช่วยบรรเทาอาการเสื่อมสมรรถภาพของข้อกระดูกในผู้สูงอายุ ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ชาวจีนนิยมบริโภคปลิงทะเลเพื่อเป็นยาอายุวัฒนะมาตั้งแต่สมัย โบราณ อีกทั้งเนื้อปลิงยังมีไขมันต่ำมาก จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้ต้องการควบคุมปริมาณไขมันในอาหารอีกด้วย

จรัสศรี และคณะ (2551); Van Dyck และคณะ (2010) รายงานว่า ทางการแพทย์พบปลิงทะเลบางชนิดมี “ฮอโลทูริน” (holothurin) จากคูวิเรียน ทูวบูล (cuvierian tubule) ที่ปลิงทะเลปล่อยออกมาเพื่อป้องกันตนเอง พบว่ามีคุณสมบัติในการขัดขวางการส่งความรู้สึกของกระแส

ประสาทได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการบำบัดความเจ็บปวดของผู้ป่วยหลังการผ่าตัดได้ นอกจากนี้ ฮอโลทูรินยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรโตซัวได้ ยิ่งไปกว่านั้นทางการแพทย์ยังพบด้วยว่า สารสกัดจากปลิงที่มีชื่อว่าสารซาโปนิน (Saponin) ซึ่งเรียกว่า "ฮอโล ท็อกซิน" (holotoxin) สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้านการกระจายตัวของเซลล์มะเร็ง และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดได้ นอกจากนี้ยังมีการนำปลิงทะเลมาเป็นส่วนผสมของโลชั่นบำรุงผิว สบู่ ยาสีฟัน หรือบรรจุแคปซูลเป็นอาหารเสริมสุขภาพ แม้กระทั่งน้ำจากการต้มปลิงทะเลยังสามารถนำมาทำยาแก้แผลพุพองหรือแก้คันจากยุงกัดอีกด้วย และด้วยนิสัยการกินของปลิงทะเลส่วนใหญ่จะเป็นสัตว์ที่กินเศษอินทรีย์สาร ที่ติดอยู่ตามเม็ดทรายไปใช้ประโยชน์ โดยกินเม็ดทรายทั้งเม็ดเข้าไปในกระเพาะอาหารเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ติดอยู่บนเม็ดทรายแล้วดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย จากนั้นจึงขับถ่ายเม็ดทรายบริสุทธิ์ออกมาภายหลัง กระบวนการกินอาหารของมันจึงเป็นการปรับปรุงสิ่งแวดล้อมใต้ท้องทะเลให้มีความสะอาดยิ่งขึ้น จนได้รับสมญานามว่า " ผู้พิทักษ์ความสะอาดใต้ท้องทะเล "

สุทธวัฒน์ (2548) รายงานว่า คอลลาเจนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูง สอดคล้องกับ Mourao (2007) ที่พบว่าคอลลาเจนจากปลิงทะเลมี major sulfated polysaccharides และ sulfated fucan และพบว่าปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในคอลลาเจนของสัตว์มีความแตกต่างกันในแต่สัตว์ละชนิด (ตารางที่ 6) ซึ่งมีกรดอะมิโนชนิด Glycine มากที่สุด นอกจากนั้นในคอลลาเจนยังพบ imino acid ชนิด Proline และ Hydroxyproline ซึ่ง imino acid จะส่งผลต่ออุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพ และส่งผลต่อความแข็งแรงของการ crooslink กับ Hydroxyproline พบว่าคอลลาเจนจากหนังหมูและวัวจะเสียสภาพในอุณหภูมิที่สูงกว่าคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ (Liu *et al*., 2007) หากคอลลาเจนเสียสภาพในอุณหภูมิต่ำจะทำให้สูญเสียพลังงานน้อยเมื่อนำไปแปรรูป ทำให้ประหยัดต้นทุนได้

ตารางที่ 2. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของปลิงทะเล

Item	Protein %	Fat %	Moisture %	Carbohydrate %	Ash %
Fresh *Acaudina molpadioides*	12.94	0.03	77.00	0.43	1.03
Fresh body wall of *Acaudina molpadioides*	11.52	0.03	87.83	0.38	0.99
Dried *Acaudina molpadioides*	68.53	0.55	8.25	--	7.56
Fresh body wall of *Thelenota ananas*	16.64	0.27	76.97	2.47	1.60
Dried *Thelenota ananas*	69.72	3.70	8.55	--	9.51
Dried *Apostichopus japonicus***	55.51	1.85	21.55	--	21.09

ที่มา: Chen (2003)

ตารางที่ 3. ปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็น และกรดอะมิโนจำเป็นของปลิงทะเล 7 ชนิด (%)

Amino acid	A	B	C	D	E	F	G
			Non-essential amino acids				
Asp	3.69	6.59	5.20	3.26	3.50	4.84	5.78
Ser	1.31	2.91	2.53	1.33	1.48	2.16	2.07
Glu	6.43	11.13	9.82	5.72	6.75	8.30	7.86
Pro	3.08	3.32	4.57	2.40	3.35	4.11	1.30
Gly	8.09	17.08	10.02	4.50	7.32	8.43	10.03
Ala	4.10	8.41	5.54	2.69	4.10	4.80	5.02
Cys	0.46	-	0.49	0.52	-	1.17	-
Tyr	0.99	1.65	1.55	1.12	1.06	1.70	1.41
Phe	1.15	1.45	1.78	1.40	1.12	1.99	1.67
Sub-total	*29.30*	*52.54*	*41.50*	*22.94*	*28.68*	*37.50*	*34.87*
			Essential amino acids				
Lys	0.64	1.02	1.59	0.38	1.09	1.45	0.92
His	0.17	0.37	0.45	2.82	0.24	0.42	0.40
Arg	3.40	6.60	4.95	1.63	3.45	4.23	4.46
Val	1.59	2.64	2.23	1.09	1.78	2.50	2.43
Met	0.89	1.03	1.40	1.21	0.90	1.49	0.86
Ile	0.76	1.39	1.45	1.93	0.98	1.51	1.64
Leu	1.49	2.64	2.64	1.74	1.75	2.63	2.59
Thr	1.68	3.44	2.68	-	1.89	2.48	2.58
Sub-total	*10.62*	*19.13*	*17.39*	*10.80*	*12.08*	*16.75*	*15.88*
Total	39.92	71.67	58.89	33.74	40.76	54.25	50.75

หมายเหตุ:

A: *H.*(*Metriatyla*) *scabra*; **B**: *H.* (*Microthele*) *nobilis*; **C**: *H.* (*Thymiosycia*) *impatiens*;

D: *H.* (*Lessonothuria*) *insignis*; **E**: *H.* (*Lessonothuria*) *multipilula*; **F**: *Actinopyga echinites*;

G: *Thelenota ananas*

ที่มา: Lovatelli และคณะ (2004)

ตารางที่ 4. แร่ธาตุต่าง ๆ ที่มีอยู่ในปลิงทะเล 7 ชนิด (%)

Element	A	B	C	D	E	F	G
Ba	2.0	6.4	1.7	1	2.9	3.6	2
Co	0.4		0.2	0.4	1.7	0.7	0.4
Cr	10.1	12.9	15.3	9.3	4.4	11.5	10.1
Cu	6.1	1.3	5.9	2	2.5	1.8	6.1
Li	2.0	1.2	1.7	1	1.9	1.4	2
Mn	19.1	2.6	4.1	5.8	11.6	36.1	4.1
Ni	2.9	2.5	5	2.3	1.9	2.1	5
Si	110	12.9	170	11.5	77.6	65	46.6
Sr	616	181	119	57.8	874	64	162
V		0.51	0.51	0.34	0.97	0.72	1.01
Zn	28.6	111	40.9	10.4	9.71	26	70.9

หมายเหตุ:

A: *H.*(*Metriatyla*) *scabra*; **B**: *H.* (*Microthele*) *nobilis*; **C**: *H.* (*Thymiosycia*) *impatiens*;

D: *H.* (*Lessonothuria*) *insignis*; **E**: *H.* (*Lessonothuria*) *multipilula*; **F**: *Actinopyga echinites*;

G: *Thelenota ananas*

ที่มา: Lovatelli และคณะ (2004)

ตารางที่ 5. วิตามิน, ซาโปนิน และ polysaccharides ใน *Acaudina molpadioides* และ *Thelenota ananas*

	Vitamins						Saponins	Polysac-charides
	B1 x 10^{-5}	B2 x 10^{-5}	B6 x 10^{-5}	A x 10^{-5}	D x 10^{-5}	E x 10^{-5}	x 10^{-3}	x 10^{-5}
Fresh *A. molpadioides*	0.114	0.15	0.039	0.15	0.0066	3.95	26.76	4.21
Fresh body wall of *A. molpadioides*	0.102	0.13	0.035	0.13	0.0059	3.52	26.50	3.75
Fresh body wall of *T. ananas*	0.782	0.23	19.000	0.35	0.0180	0.90	379.40	4.12

ที่มา: Chen (2003)

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 6. กรดอะมิโนของคอลลาเจนในสัตว์แต่ละชนิด (ส่วน ใน 1,000 ส่วน)

Amino acid	**ปลิงทะเล**		**ดาวทะเล**	**เม่นทะเล**	**ปลา**		**วัว**
	Cucumaria frondosa	***Stichopus japonicus***	***Asterias amurensis***	***Eucidaris tribuloides***	***Ictalurus punctatus***	***Lagocepharus gloveri***	
Aspartic acid	60	59.5	59	30	57.2	27	45
Threonine	29	34.3	24	42	27.6	20	18
Serine	54	44.6	69	46	38.7	28	33
Glutamic acid	87	103.9	84	68	106.6	95	75
Glycine	333	328.7	344	330	233.3	363	330
Alanine	106	110.6	112	98	101.2	96	119
Valine	33	24.3	22	21	26.5	24	21
Methionine	7	9.0	13	21	14.9	21	6
Isoleucine	18	18.4	16	11	14.8	12	11
Leucine	25	18.6	15	27	25.7	20	23
Tyrosine	9	8.2	5	6	4.3	6	3
Phenylalanine	10	7.4	3	6	20.3	28	3
Lysine	7	5.0	14	7	41.1	25	26
Histidine	2	3.0	3	2	8.7	5	5
Arginine	49	53.2	55	53	84.8	52	50
Proline	101	94.7	95	120	101.3	93	121
Hydroxyproline	64	66.3	61	107	75.9	77	94
Hydroxylysine	5	10.3	5	6	-	8	7
อ้างอิง	Trotter *et al*., 1995	Cui *et al*., 2007	Kimura *et al*., 1993	Trotter and Koob, 1994	Liu *et al*., 2007	Senaratne *et al*., 2006	Liu *et al*., 2007

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 3

การทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

1 ปลิงทะเลขาวแห้ง (*Holothuria scabra*)
2 ปลิงทะเลดำแห้ง (*Holothuria leucospilota*)
3 น้ำกลั่น, น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
4 ถุงพลาสติก
5 ยางวง
6 แท่งแก้ว
7 ปิเปตพร้อมจุกยาง
8 ขวด Duran
9 โกร่งบด
10 กระดาษฟอยด์
11 ขวดสีชา
12 cuvette
13 magnetic bar
14 มีด
15 กระดาษกรองเบอร์ 1
16 กล่องโฟม
17 กระดาษทิชชู
18 ถาด
19 ถุงมือ
20 ช้อนตักสาร
21 กระบอกตวง
22 บีกเกอร์
23 น้ำแข็ง
24 กะละมัง
25 Forcep
26 หลอด centrifuge ขนาด 15 mL.
27 เครื่องมือผ่าตัดเล็ก
28 ทิป (microtip)

เครื่องมือ

1 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ
2 hot plate
3 pH meter
4 เครื่องชั่งสาร 2 และ 4 ตำแหน่ง
5 Micropipette
6 เครื่อง Spectrophotometer
7 เครื่องผสมสาร (vortex)
8 ตู้แช่แข็ง -20°C
9 ตู้เย็น
10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
11 กล้องถ่ายรูป
12 Freeze Dryer

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารเคมี

1 1 M HCl	9 Bovine serum albumin (BSA)
2 0.1 M Acetic acid	10 porcine pepsin
3 0.2 M Acetic acid	11 0.02 M Na_2HPO_4, pH 8.0
4 0.5 M Acetic acid	12 EDTA
5 0.1 M NaOH	13 Potassium iodide
6 $CuSO_4 5H_2O$	14 95% ethanol
7 0.8 M NaCl	15 6 M HCl
8 Tris-base	16 6 M NaoH

วิธีการทดลอง

ทำการสกัดคอลลาเจนจากผนังลำตัวของปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) จากนั้นทำการทดลอง 4 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 ตรวจสอบการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

การทดลองที่ 2 ศึกษากรดอะมิโนของคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

การทดลองที่ 3 ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพโดยศึกษาอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) เสียสภาพ

การทดลองที่ 4 ทดสอบความสามารถในการละลายของคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

1. เก็บตัวอย่างและการสกัดคอลลาเจนจากปลิงทะเล

เก็บตัวอย่างปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) จากธรรมชาติในทะเลฝั่งอันดามันบริเวณเกาะปู อ. เหนือคลอง จ. กระบี่ ห่างจากฝั่งประมาณ 10-15 กิโลเมตร น้ำลึกประมาณ 1-2 เมตร น้ำหนักตัวปลิงประมาณ 200-300 กรัม และคัดเลือกปลิงทะเลที่ต้องการ โดยเลือกเฉพาะปลิงที่มีสุขภาพดี ไม่มีแผลที่ผิวหนัง ผิวหนังเรียบมีความแวววาว มี mucous layer ที่ใส เมื่อถูกสัมผัสจะเคลื่อนไหวได้ช้า ๆ และบรรจุปลิงทะเลในถุงพลาสติกที่มีน้ำทะเล เติมอากาศ มัดปากถุงให้แน่น จากนั้นใส่กล่องโฟมขนส่งมายังคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา และย้ายปลิงทะเลลงถังเลี้ยง

- เตรียม crude collagen fibril

กระบวนการทั้งหมดจะเตรียมที่อุณหภูมิ 4 ºC โดยนำปลิงทะเลขาว และปลิงทะเลดำแยกอวัยวะภายในออก รวมทั้งเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อภายในออกด้วย forcep จากนั้นตัดผนังลำตัวเป็นชิ้นเล็กๆ และล้างกับน้ำกลั่น ชั่งปลิงทะเล 100 กรัม (น้ำหนักเปียก) คนกับน้ำกลั่น 1 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นแทนที่น้ำกลั่นด้วย 4 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1 M tris-HCl, pH 8.0 และคนข้ามคืน จากนั้นเทของเหลวออก ทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร คนช้าๆ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จากนั้นใส่น้ำกลั่น 500 ml คนเป็นเวลา 2 วัน และนำไป centrifuge ที่ 9000g เป็นเวลา 5 นาที เก็บรวบรวมส่วน supernatant ไว้เป็น collagen fibril และส่วนที่เป็นก้อนกลมจะคนอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น 500 ml และนำไป centrifuge ที่ 9000g เป็นเวลา 5 นาที เก็บรวบรวมส่วน supernatant นำส่วน supernatant ทั้งหมดที่ได้ centrifuge ที่ 10,000g เป็นเวลา 30 นาที และจะได้ crude collagen fibril ซึ่งเป็นส่วนที่ตกตะกอน จากนั้นนำ crude collagen fibril ทำการ lyophilize (Cui *et al*., 2007)

- การสกัด pepsin-solubilize collagen

นำ crude collagen fibril ที่ผ่านการ lyophilize คนกับ 0.1 M NaOH (20 v/w) เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกไป และกำจัดเอนไซม์ protease ในคอลลาเจนออกไป (Sato *et al*., 1987) ส่วนที่เหลือหลังจากสกัดด้วยอัลคาไลด์ จะล้างด้วยน้ำกลั่น และคนกับ 0.5 M acetic acid (10 v/w) และใส่ porcine pepsin ในอัตราส่วน enzyme/substrate 1:100 (w/w) ทำการย่อยเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 12,000g เป็นเวลา 60 นาที รวบรวมส่วนที่เป็น supernatant ซึ่งเป็น pepsin-solubilize collagen (PSC) ทำการแยกเกลือออกโดยเติม NaCl ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 M จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบต่ำ โดยละลายใน 0.5 M acetic acid เพื่อให้ตกตะกอนเร็วขึ้น และล้างของเสียหลายๆ ครั้ง ด้วย 0.02 mol/L ของ Na_2HPO_4 (pH 8.0) เพื่อไม่ให้มี pepsin จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบต่ำ และรวบรวมตะกอน ทำการล้างด้วย 0.5 M acetic acid และล้างอีกครั้งด้วย 0.1 M acetic acid เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำ lyophilize (Cui *et al*., 2007)

2. ตรวจสอบการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้ (การทดลองที่ 1)

ใช้ UV Spectrophotometer ช่วงความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร

3. การวิเคราะห์กรดอะมิโนจากคอลลาเจนที่สกัดได้ (การทดลองที่ 2)

ส่งคอลลาเจนจากปลิงทะเลที่ผ่านการ lyophilize ไปวิเคราะห์ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด โดยใช้เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งการจำแนกกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะหาได้จากการเปรียบเทียบ retention time กับ authentic standards

4. ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพโดยศึกษาอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนที่สกัดได้เสียสภาพ (การทดลองที่ 3)

ใช้ Differential Scanning Calorimeter วิเคราะห์อุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพ ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วง 10-70 ºC และบันทึกการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (ส่งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

5. ทดสอบความสามารถในการละลาย (การทดลองที่ 4)

ใช้วิธีการของ Montero และคณะ (1991) โดยทำการทดสอบที่ระดับ pH 1-10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี Biuret method

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

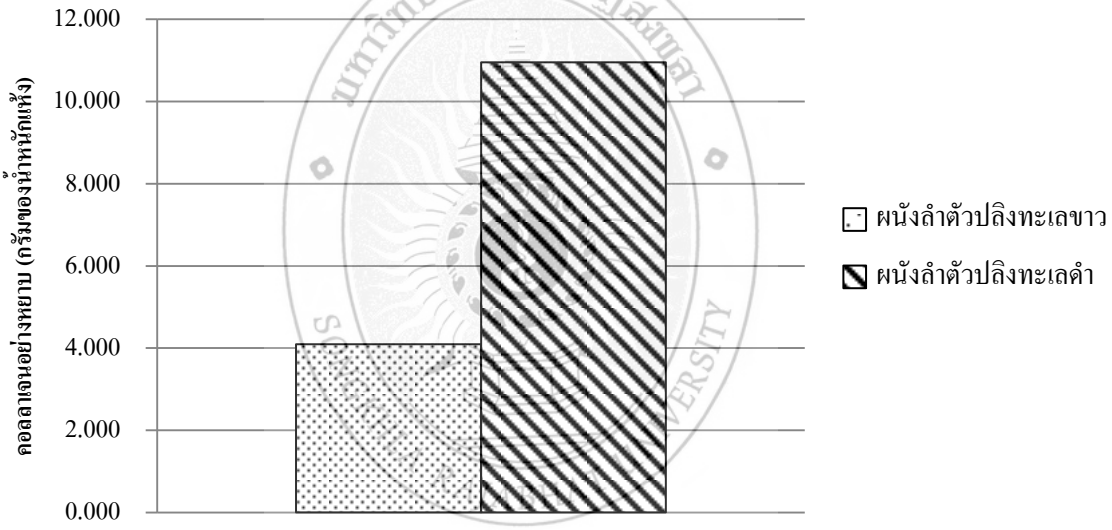
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล/ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. ผลการสกัดคอลาเจนจากปลิงทะเล

1.1 Crude Collagen Fibril

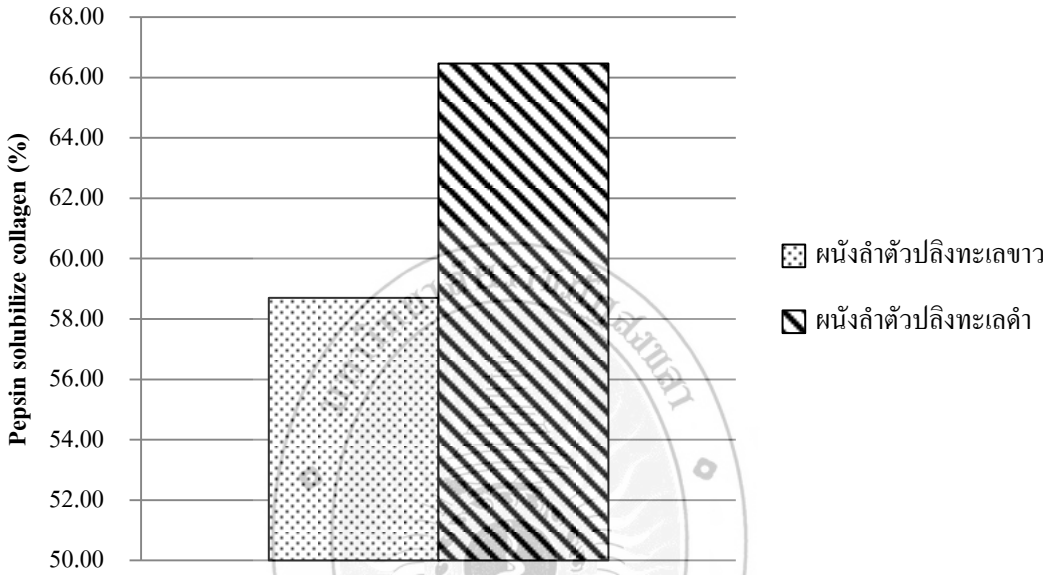
จากการทดลองการสกัดคอลลาเจนอย่างหยาบจากปลิงทะเล พบว่า ผนังลำตัวของปลิงทะเลขาวและผนังลำตัวของปลิงทะเลดำ 100 กรัมของน้ำหนักเปียก มีคอลลาเจนอย่างหยาบ 4.091 และ 10.955 กรัมของน้ำหนังแห้ง ตามลำดับ ซึ่งพบว่าคอลลาเจนอย่างหยาบที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลดำมีปริมาณมากกว่าปลิงทะเลขาว ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8. น้ำหนักแห้งของคอลลาเจนอย่างหยาบ (Crude Collagen Fibril)

1.2 pepsin-solubilize collagen (PSC)

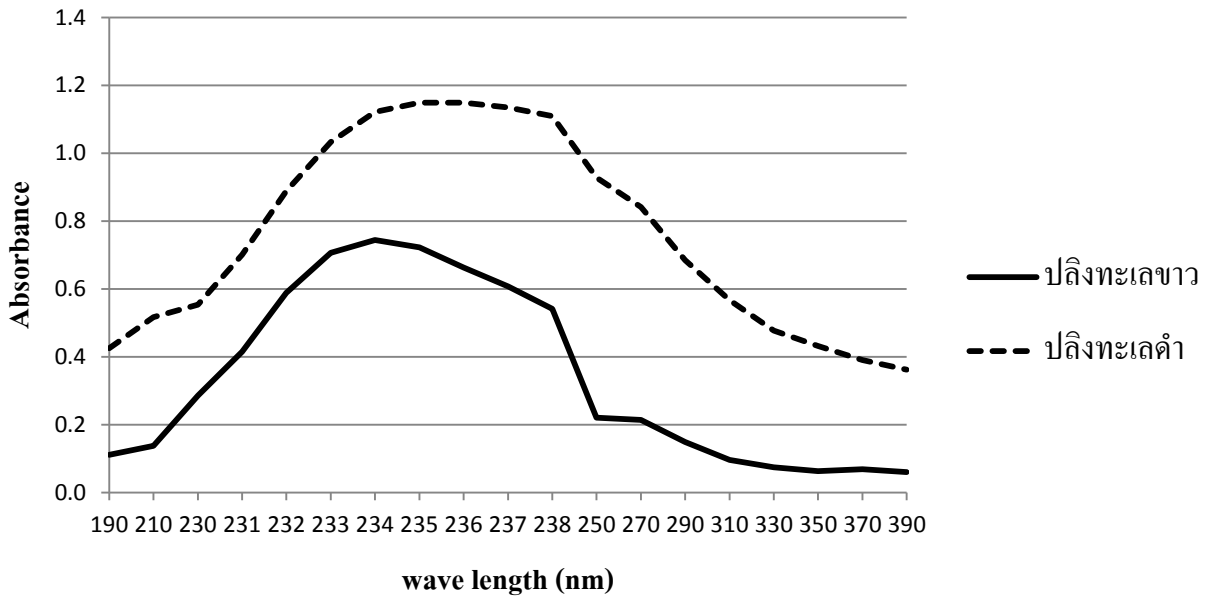
จากการทดลองสกัด pepsin-solubilize collagen จากปลิงทะเล พบว่า ในผนังลำตัวของปลิงทะเลขาว และผนังลำตัวของปลิงทะเลดำ มี pepsin-solubilize collagen 58.70% และ 66.46% ตามลำดับ จากการสกัดต่อจาก Crude Collagen Fibril ซึ่ง pepsin-solubilize collagen จากปลิงทะเลดำ มีปริมาณมากกว่าปลิงทะเลขาว ดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับคอลลาเจนจากผนังลำตัวปลิงทะเลชนิด *Bohadshia* spp. ที่มี pepsin-solubilize collagen ปริมาณ 65% (Siddiqui *et al*., 2013)



ภาพที่ 9. pepsin-solubilize collagen (%)

2. ตรวจสอบการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้

จากการสแกนคอลลาเจนในช่วงความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร พบว่า คอลลาเจนจากปลิงทะเลขาว สามารถดูดกลืนแสงยูวีสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร และคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำสามารถดูดกลืนแสงยูวีสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 10 เนื่องจากคอลลาเจนมีปริมาณของกรดอะมิโนชนิดฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน และไทโรซีนในปริมาณที่น้อยมาก สอดคล้องกับคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิด *Stichopus japonicus* ในการวิจัยของ Cui และคณะ (2007) จากสมบัติการดูดกลืนแสงยูวีนี้สามารถใช้แยกคอลลาเจนออกจากโปรตีนชนิดอื่นได้ โดยโปรตีนชนิดอื่นส่วนใหญ่ดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



ภาพที่ 10. UV spectrum ของ pepsin-solubilize collagen จากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ

3. การวิเคราะห์กรดอะมิโนจากคอลลาเจนที่สกัดได้

จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนจากคอลลาเจนของปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ พบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบปริมาณมากที่สุด คือ ไกลซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุด จึงมีบทบาทเด่นในโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใย และกรดอะมิโนที่มักพบในคอลลาเจนคือโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีน ซึ่งช่วยให้คอลลาเจนเสถียรต่อความร้อน พบว่าคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวมีปริมาณโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนรวมกัน 158 ส่วนใน 1,000 ส่วน (93+65) และคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำมีปริมาณ 158 ส่วนใน 1,000 ส่วน (88+70) ซึ่งมีค่าเท่ากับคอลลาเจนจาก *Holothuria parva* 158 ส่วนใน 1,000 ส่วน (96+62) (Adibzadeh *et al*., 2014) และใกล้เคียงกับคอลลาเจนจากปลิงทะเล *S. japonicas* (161 ส่วนใน 1,000 ส่วน; 95+66) (Cui *et al*., 2007) แต่มีปริมาณน้อยกว่าคอลลาเจนจากหนังปลา ดังแสดงในตารางที่ 7

4. ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพโดยศึกษาอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนที่สกัดได้เสียสภาพ

อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจน (Transition temperature; T_{max}) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง differential scanning calorimeter (DSC) ซึ่งสังเกตจาก peak ของกราฟในภาพที่ 11 พบว่าค่า T_{max} ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำเท่ากับ 48.94 และ 50.88 °C ตามลำดับ ซึ่งค่า T_{max} ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำมีค่าสูงกว่าปลิงทะเลขาว เนื่องจากกรดอะมิโน Hydroxyproline มีค่าสูงกว่า อาจทำให้เสถียรต่อความร้อนมากกว่าคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาว และพบว่าค่า T_{max} ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำมีค่าใกล้เคียงกับคอลลาเจนจากปลิงทะเล

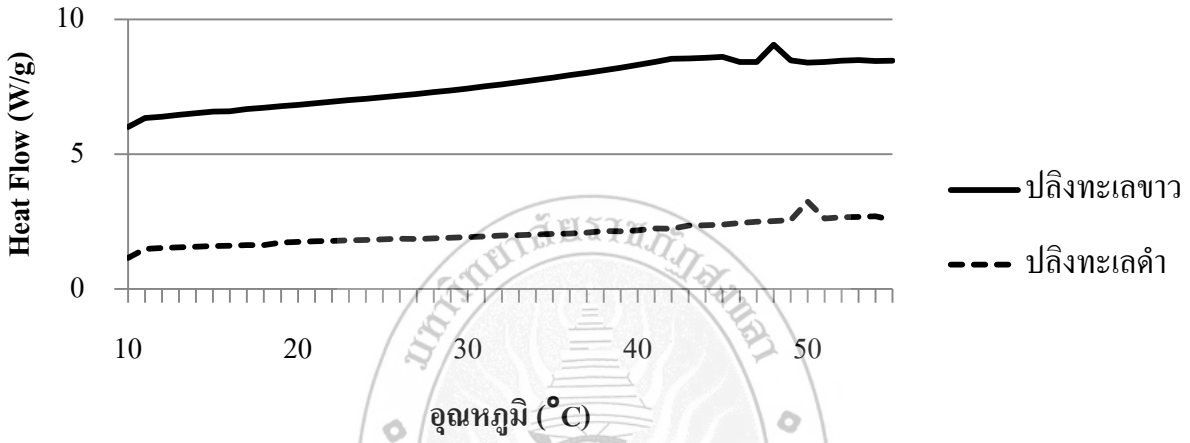
H. parva (46.94 °C) (Adibzadeh *et al*., 2014) แต่แตกต่างกับคอลลาเจนจากปลิงทะเล *Stichopus japonicas* (57.0 °C) และคอลลาเจน Type I จากปลาคาร์ฟ (62 °C) (Cui *et al*., 2007) อาจเป็นไปได้ว่าปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำอยู่ใน genus เดียวกันกับปลิงทะเล *H. parva*

ตารางที่ 7. องค์ประกอบของกรดอะมิโนของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ (ส่วนใน 1,000 ส่วน)

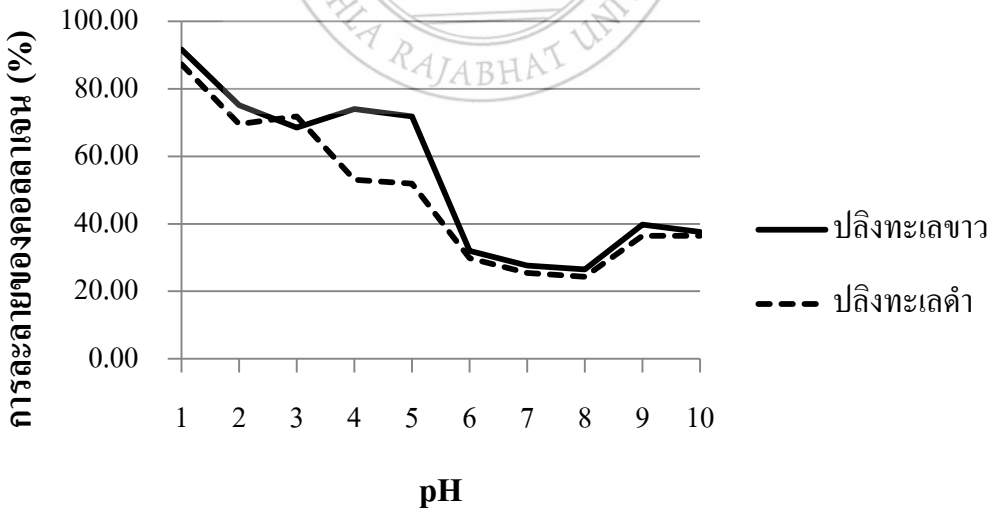
กรดอะมิโน	*H. scabra*	*H. leucospilota*	*S. japonicus*	หนังปลาคาร์ฟ	หนังปลาสลาด
Aspartic acid	65.71±0.22	67.31±1.93	59.5 ± 1.5	45	46±0
Threonine	33.94±0.07	35.44±0.94	34.3 ± 1.0	18	26±0
Serine	26.34±0.19	24.50±0.64	44.6 ± 1.2	39	37±0
Glutamic acid	123.35±0.34	111.73±3.28	103.9 ± 2.5	75	85±0
Glycine	255.91±6.04	202.80±6.17	328.7 ± 5.0	330	337±1
Alanine	102.44±0.79	80.44±2.35	110.6 ± 4.5	119	116±0
Valine	21.67±0.23	18.74±0.44	24.3 ± 0.5	21	18±0
Cysteine	0±0	0±0	-	-	0±0
Methionine	5.58±0.75	5.95±0.57	9.0 ± 0.5	6	12±0
Isoleucine	10.72±0.16	10.78±0.21	18.4 ± 1.0	11	10±0
Leucine	22.02±0.21	19.41±0.95	18.6 ± 0.5	23	22±0
Tyrosine	13.66±0.80	8.73±0.97	8.2 ± 0.2	3	4±0
Phenylalanine	8.86±0.14	9.77±0.71	7.4 ± 0.2	3	15±0
Lysine	5.63±0.13	8.28±0.35	5.0 ± 0.2	26	27±0
Histidine	3.03±0.07	4.67±0.33	3.0 ± 0.1	5	5±0
Arginine	76.40±0.86	70.61±2.15	53.2 ± 3.2	50	52±0
Tryptophan	0±0	0.89±0.04	-	-	-
Proline	93.02±0.78	87.85±3.93	94.7 ± 4.5	121	113±0
Hydroxyproline	65.29±0.53	69.86±0.34	66.3 ± 4.2	94	75±1
อ้างอิง	การศึกษาครั้งนี้	การศึกษาครั้งนี้	Cui *et al*., 2007	Li *et al*., 2004	นรินทร์ และ วรางคณา, 2558

5. ทดสอบความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำที่ pH 1-10 ดังแสดงในภาพที่ 12 พบว่าคอลลาเจนทั้งปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ ละลายได้ดีที่สุดที่ pH 1-5 ซึ่งมีค่าการละลายสูงที่สุดที่ pH 1 และค่าการละลายลดลงอย่างชัดเจนในช่วง pH 6-8 และที่ pH สูงกว่า 8 มีการละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับคอลลาเจนจากหนังปลาสลาดในการวิจัยของนรินทร์และวรางคณา (2558)



ภาพที่ 11. DSC thermogram ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ



ภาพที่ 12. ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำที่ pH แตกต่างกัน

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

Pepsin-solubilize collagen (PSC) จากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) มีคอลลาเจน 58.70 และ 66.46% ตามลำดับ จากการสกัดต่อจาก Crude Collagen Fibril ซึ่ง PSC ที่สกัดได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันระหว่าง PSC จากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ คือ สามารถดูดกลืนแสงยูวีสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 234 และ 235 นาโนเมตร ตามลำดับ และทั้ง 2 ชนิด มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบปริมาณมากที่สุด คือ ไกลซีน มีปริมาณโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนรวมกัน เท่ากับ 158 ส่วนใน 1,000 ส่วน อุณหภูมิในการเสียสภาพของ PSC จากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำเท่ากับ 48.94 และ 50.88 °C ตามลำดับ และความสามารถในการละลายของ PSC จากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ ละลายได้ดีที่สุดที่ pH 1-5 ซึ่งมีค่าการละลายสูงที่สุดที่ pH 1 ดังนั้นคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาว และปลิงทะเลดำ เป็นแหล่งคอลลาเจนอีกแหล่งหนึ่งที่สามารถใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่นด้านการแพทย์ ด้านเภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง ฯลฯ ซึ่งเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งแก่ผู้ผลิต

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปทำผลิตภัณฑ์
2. ควรทดสอบหาคอลลาเจนจากสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ที่มีในท้องถิ่น

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

เอกสารอ้างอิง

จรัสศรี อ๋างตันญา, วัชราภรณ์ ไตรพาณิชย์กุล, วัลลภา เกื้อด้วง, ศิรินทิพย์ สังข์จีน, ทัศนี จันทร์ดนตรี และไผทรัตน์ สิงห์ดำ. 2551. ตัวอย่างปลิงทะเลในพิพิธภัณฑ์สัตว์และพืชทะเล สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน. เอกสารเผยแพร่กลุ่มพิพิธภัณฑ์และสถานแสดงพันธุ์สัตว์และพืชทะเล ลำดับที่ 6. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลชายฝั่ง ทะเลและป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดวัตน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด โกมารทัต, พิณทิพ รื่นวงษา, ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สนธยานนท์, สุมาลี ตั้งประดับกุล, มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. 2542. ชีวเคมี. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์. มหาลัยมหิดล. หน้า 89-123.

นรินทร์ ทาหอม และวรางคณา สมพงศ์. 2558. สมบัติของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 23(2): 257-267.

นริศ เจนวิริยะ. 2544. โรควัวบ้าเกิดจากสารโปรตีน. วารสารใกล้หมอ. 25(4): 74-75.

นิรนาม. 2544. การกลับมาของวัวบ้า. วารสารอัพเดท. 16(162): 68-69.

วิชัย โชควิวัฒน. 2558. โรควัวบ้า-Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). แหล่งที่มา: http://www.thailabonline.com/brain1bse.htm. 20 กุมภาพันธ์ 2558

วิลัยภรณ์ วรเวษฐ. 2550. Prion. แหล่งที่มา: https://www.eduzones.com/knowledge-2-5-49770.html. 20 กุมภาพันธ์ 2558

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548. เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอเดียนสโตร์: กรุงเทพฯ.

อารมณ์ มุจรินทร์. 2558. "ปลิง" สัตว์สารพัดประโยชน์. แหล่งที่มา: http://www.thaigoodview.com/node/62792. 11 พฤศจิกายน 2558

Adibzadeh, N., Aminzadeh, S., Jamili, S., Karkhane, A.A. and Farrokhi, N. 2014. Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin of sea cucumber *Holothuria parva*. Applied biochemistry and biotechnology, 173: 143–154.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye blinding. Analytical Biochemistry, 12: 248-254.

Chen, J. 2003. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. SPC Beche–de–Mer Information Bulletin, 18 : 18–23.

Cluzel, C., Lethias, C., Garrone, R. and Exposito, J.Y. 2000. Sea urchin fibrillar collagen 2a chain participates in heterotrimeric molecules of $(1\alpha)_2 2\alpha$ stoichiometry. Matrix Biology, 19: 545–547.

Cui, F., Xue, C., Li, Z., Zhang, Y., Dong, P., Fu, X. and Gao, X. 2007. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicas*. Food Chemistry, 100: 1120–1125.

Francosis, C.J. and Glincher, M.J. 1967. Extraction process for a pharmaceutical product. Biochim Biophys Acta, 133: 91.

Harkness, R.D. 1961. Biological functions of collagen. Biology Review, 36: 399-463.

Kimura S., Omura Y., Ishida M. and Shirai H. 1993. Molecular characterization of librillar collagen from the body wall of starfish Asterias amurensis. Comparative Biochemistry and Physiology, MB: 663468.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chemistry, 89: 363-372.

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

Lehninger, A.L. 1971. A soluble, heat-labile, high-affinity Ca^{2+} - binding factor extract from rat liver mitochondria. Biochemical and Biophysical Research Communications, 42: 312-318.

Li, G.Y., Fukunaga, S., Takenouchi, K. and Nakamura, F. 2005. Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. International Journal of Cosmetic Science, 27: 101-106.

Li, H., Liu, B.L., Gao, L.Z. and Chen, H.L. 2004. Studies on bullfrog skin collagen. Food chemistry, 84: 65-69.

Liu, H.Y., Li, D. and Guo, S.D. 2007. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctaus*). Food Chemistry, 101: 621-625.

Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J.-F. and Mercier, A. 2004. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome, FAO.

Mizuta. S., Miyayi, T., Nishimiya, T. and Yoshinaka, R. 2004. Partial characterization of collagen in several bivalve molluses. Food Chemistry, 87: 83-88.

Montero, P., Jimenez-Colmenero, F. and Borderias, J. 1991. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin. Journal the Science of Food and Agriculture, 54: 137-146.

Morales, J., Montero, P. and Moral, A. 2000. Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2142-2148.

Moskowitz, W. 2000. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. Semin Arthritis Rheum, Oct: 30(2): 87-99.

Mourao, P. A. S. 2007. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. Medical and Biological Research, 40 : 5-17.

Myllyharju, J. 2005. Intracellular post-translational modifications of collagens. Current Topics in Medicinal, 247: 115-147.

Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N. 2001. Isolation and characterization of collgen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). Food Chemistry, 72: 425- 429.

Olsen, D., Yang, C., Bodo, M., Chang, R., Leigh, S., Baez, J., Carmichael, D., Perala, M. and Hamalainen, E.R. 2003. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. Advance Drug Delivery Review, 55: 1547-1567.

Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I. 1995. COLLAGEN: Molecular Biology, Diseases and Potentials for Therapy. Annual Review of Biochemistry, 64: 403-434.

Piez, K.A., Eiger, A. and Lewis, M.S. 1963. Extraction of gelatin. Biochemistry, 2: 58.

Piez, K.A. 1965. Characterization of a collagen from codfish skin containing three chromatographically different alpha chains. Biochemistry, 4: 2590.

Robinson, J. J. 1997. Comparative biochemical analysis of sea urchin peristome and rat tail tendon collagen. Comparative Biochemistry and Physiology, 117B: 307–313.

Sadowska, M., Kolodziejska, I. and Niecikowska, C. 2003. Isolation of collagen from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chemistry, 81: 257-262.

Saito, M., Kunisaki, N., Urano, N. and Kimura, S. 2002. Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). Food Chemistry and Toxicology, 67: 1319–1322.

Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M. and Shimizu, Y. 1987. Isolation of native acid-soluble collagen from fish muscle. Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 1431–1436.

Senaratne, L.S., Park, P. and Kim, S. 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. Bioresource Technology, 97: 191-197.

Shen, X.R., Kurihara, H. and Takahashi, K. 2007. Characterization of molecular species of collagen in scallop mantle. Food Chemistry, 102: 1187-1191.

Siddiqui, Y. D., Arief, E.M., Yusoff, A., Suzina A.H. and Abdullah, S.Y. 2013. Isolation of pepsin-solubilized collagen (PSC) from crude collagen extracted from body wall of sea cucumber (*Bohadschia* spp). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(2): 555-559.

Sivakumar, P., Suguna, L. and Chandrakasan, G. 2000. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissues of the marine crab, *Scylla serrata*. Comparative Biochemistry and Physiology, 125B: 555–562.

Swatschek, D., Schatton, W., Kellermann, J., Muller, W.E.G. and Kreuter, J. 2002. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 53: 107-113.

Tamimi, E., Kumarasami, B., Doillon, C., Gbureck, U., Nihouannen, D.L., Cabarcos, E.L. and Barralet, J.E. 2008. Brushite-collagen composite for bone regeneration. Acta Biomaterialia, 4: 1315-1321.

Toral-Granda, V., Lovatelli, A. and Vasconcellos, M. 2008. Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 516. Rome, FAO.

Trotter J. A. and Koob T. J. 1994. Biochemical characterization of fibrillar collagen from the mutable spine ligament of the sea-urchin Eucidaris tribuloides. Comparative Biochemistry and Physiology, 107B: 125-134.

Trotter, J.A., Lyons-Levy, G., Thurmond, F.A. and Koobt, T.J. 1995. Covalent composition of collagen fibrils from the dermis of the sea cucumber, *Cucumaria frondosa*, a tissue with mutable mechanical properties. Comparative Biochemistry and Physiology, 112A: 463-478.

Van Dyck, S., Gerbaux, P. and Flammang, P. 2010. Qualitative and Quantitative Saponin Contents in Five Sea Cucumbers from the Indian Ocean. Marine Drugs, 8 : 173-189.

Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L. and Hu, Q. 2007. Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). Journal of Food Science, 72: E450-E455.

Whang. J.H., Mizuta, S., Yokoyama, Y. and Yoshinaka, R. 2007. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenojei*). Food Chemistry, 3: 921-925.

Yan, M., Li, B., Zhao, X., Ren, G., Zhuang, Y., Hou, H., Zhang, X., Chen, L. and Fan, Y. 2008. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*). Food Chemistry, 107: 1581-1586.

Yoshinaka, R., Sato, K., Itoh, Y., Nakajima, S. and Sato, M., 1989. Content and partial characterisation of collagen in crustacean muscle. Comparative Biochemistry and Physiology, 94B: 219–223.

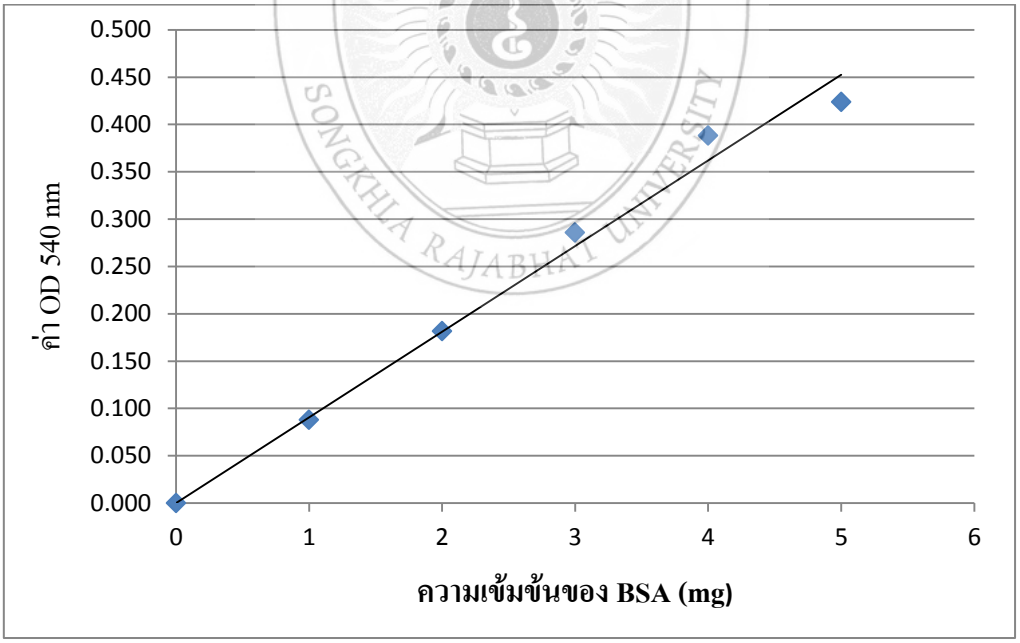
Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y. and Wu, X. 2007. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Food Chemistry, 103: 906-912.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงค่า OD_{540} ของมาตรฐานโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรท (Biuret method)

ค่าความเข้มข้นของ BSA(mg)	ค่า OD_{540} ครั้งที่ 1	ค่า OD_{540} ครั้งที่ 2	ค่า OD_{540} ครั้งที่ 3	ค่า OD_{540} เฉลี่ย
0	0	0	0	0.000
1	0.09	0.088	0.085	0.088
2	0.202	0.178	0.164	0.181
3	0.286	0.298	0.273	0.286
4	0.389	0.382	0.393	0.388
5	0.419	0.436	0.416	0.424



ภาพภาคผนวกที่ 1. แสดง Standard curve ของวิธีไบยูเรทโดยมีค่า R หรือ R-squared = 0.9878 และ y = 0.0905x

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-สกุล นายศรัณย์ รักษาพราหมณ์

Mr. Sarun Rucksapram

หมายเลขบัตรประชาชน 5909899027815

ตำแหน่ง อาจารย์ ระดับ 7

หน่วยงาน โปรแกรมวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา 90000 โทร. 074 – 336964, 089 - 8707391

E-mail sarunvar@gmail.com

ประวัติการศึกษา ทษ.บ. สัตวศาสตร์ (ประมงน้ำจืด) มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วท.ม. (วิทยาศาสตร์การประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ การเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม

ประสบการณ์ในงานวิจัย

- การศึกษาโรคของกุ้งกาลาดำ คุณสมบัติของน้ำและชนิดของแพลงก์ตอนในบ่อที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ
- พ.ศ. 2552 (ผู้ร่วมวิจัย) เรื่อง การใช้น้ำหมักชีวภาพจากเปลือกกล้วยนางพญาในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในโครงการวิจัยใหญ่ เรื่อง การพัฒนาการปลูก การแปรรูป และการบริหารผลิตภัณฑ์จากกล้วยนางพญา [Musa (ABB Group) ‘ Kluai Nang Paya’] เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ชุมชน (แหล่งทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

2. ชื่อ-สกุล นางสาววิจิตรา ตุ้งซี่

Mrs. Wijittra Tungse

ตำแหน่ง อาจารย์

หมายเลขบัตรประชาชน 1809700084869

หน่วยงาน โปรแกรมวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา 90000 โทร. 074-336964 , 086-9459044

E-mail aquaticfirn@hotmail.com

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพทางน้ำ) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วท.ม. (วาริชศาสตร์) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ ปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ โรคสัตว์น้ำ

ประสบการณ์ในงานวิจัย

Dissertations:

1. Extraction of Native Collagen from Abalone (*Haliotis diversicolor*). Master's Science Project, 2008. Department of Aquatic Biotechnology, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani, Thailand. (Dr. Duangkhae Kanjanasopa, Adviser)
2. Histology and Chemical Compositions of Gonad, and Breeding Season of Sea Cucumber *Holothuria scabra*, in the South of Thailand (Andaman Zone). Master's Thesis, 2014. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand. (Dr. Pattira Pongtippatee, Adviser; Prof. Dr. Boonsirm Withyachumnarnkul, Assoc. Prof. Dr. Wutiporn Phromkunthong, Dr. Nopphakaew Chareonthiphakorn and Dr. Duangkhae Kanjanasopa, Co-Adviser)

Proceeding:

1. **Wijittra Tungse**, Pattira Pongtippatee, Duangkhae Kanjanasopa, Nopphakaew Chareonthiphakorn, Wutiporn Phromkunthong, and Boonsirm Withyachumnarnkul. 2013. The study of seasonal breeding, gonad development and chemical compositions of gonad in sea cucumber *Holothuria scabra*. 4th Congress on Hatyai University, Thailand, pp. 14-24.

Research Papers:

1. **วิจิตรา ตุ้งซี่**, อรสา บากา และสุนันทา โพธิ์งาม. 2559. ศึกษาวิธีการสลบกุ้งเครย์ฟิช. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 (มกราคม – เมษายน) หน้า 1-13.

Academic Papers:

1. **วิจิตรา ตุ้งซี่**. 2560. การกระตุ้นปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) ให้เกิดการวางไข่. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, ปีที่ 25 ฉบับที่ 1 (มกราคม – กุมภาพันธ์) หน้า 75-85.