รายงานการวิจัย

การศึกษาคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

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

นางสาววิจิตรา ตุ้งซี่
นายศรัณย์ รักษาพราหมณ์

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
พ.ศ. 2558

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

ผู้วิจัย วิจิตรา ตุ้งซี่ และศรัณย์ รักษาพราหมณ์

คณะ เทคโนโลยีการเกษตร

ปี 2560

บทคัดย่อ

การศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากผนังลำตัวปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford's method) และ SDS-PAGE พบว่าผนังลำตัวของปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ 100 กรัม ของน้ำหนักเปียก สามารถสกัดคอลลาเจนหยาบได้ 4.09 และ 10.95 กรัม ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และสามารถสกัด pepsin-solubilized collagen (PSC) จากคอลลาเจนหยาบได้ประสบผลสำเร็จ ปริมาณค่อนข้างสูง คือ 58.70 และ 66.46% ตามลำดับ ซึ่ง PSC มีลักษณะเบา เป็นเส้นใย มีสีขาวในปลิงทะเลขาว แต่ในปลิงทะเลดำมีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม เมื่อนำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret method และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของคอลลาเจนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ทั้ง 2 ชนิด เป็นโปรตีน ซึ่งเป็นคอลลาเจน type I ประกอบด้วยสายเปปไทด์ α_1 มีมวลโมเลกุลประมาณ 150 kDa ดังนั้นปลิงทะเลขาว และปลิงทะเลดำ จึงเป็นแหล่งคอลลาเจนอีกแหล่งหนึ่งสำหรับการประยุกต์ใช้

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

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

Researcher Wijittra Tungse and Sarun Rucksapram

Faculty Agricultural Technology

Year 2017

Abstract

Collagen extraction from the body wall of sea cucumber (*Holothuria scabra* and *Holothuria leucospilota*). And the purity of the extracted collagen fibril determined based on Bradford's method and SDS- PAGE were studied. 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. The *H. scabra* PSC were soft and white fiber but dark brown color was observed in *H. leucospilota* PSC. Interestingly, analyzed the protein quantity by Bradford's method and the purity of extracted collagen by SDS-PAGE that was protein and eletrophoretic pattern of type I collagen consisting of major component $\alpha 1$ of approximately 150 kDa. Therefore, *H. scabra* and *H. leucospilota* is alternative collagen source for using in application ways.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

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

วิจิตรา ตุ้งซี่
ศรัณย์ รักษาพราหมณ์
พฤษภาคม 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	14
วิธีการทดลอง	15
บทที่ 4 ผลการทดลองละวิจารณ์ผล	18
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	32
ประวัติผู้วิจัย	39

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. คอลลาเจนแต่ละชนิดในเนื้อเยื่อต่างๆ 13
2. ค่า OD 595 ของมาตรฐานโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด 21
3. ค่า OD595 ของคอลลาเจน pepsin-solubilize collagen (PSC) ที่สกัดได้จากปลิงทะเล 23
4. คอลลาเจนจากสัตว์น้ำชนิดต่างๆ 23
5. แสดงขนาดมวลโมเลกุล (kDa) ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิดต่างๆ 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. ลักษณะสปิคุลของปลิงทะเล	11
6. ลักษณะแผ่นวงแหวนหินปูนของปลิงทะเล: A, Holothuriidae; B, Cucumariidae; C, D Phyllophoridae; E, Stichopodidae และ F, Synaptidae	11
7. ลักษณะเรสไปราทอรี่ทรี (respiratory tree) ของปลิงทะเล	12
8. น้ำหนักแห้งของคอลลาเจนอย่างหยาบ (Crude Collagen Fibril)	18
9. ลักษณะคอลลาเจนอย่างหยาบ (Crude Collagen Fibril)	19
10. pepsin-solubilize collagen (%)	19
11. ลักษณะ pepsin-solubilize collagen	20
12. Standard curve ของวิธีแบรดฟอร์ดโดยมีค่า R2 หรือ R-squared = 0.9886 และ y = 1.3015x	21
13. แสดง SDS-PAGE ของสารละลายคอลลาเจน	24

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) คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใยยาว (Fibrous protein) มีโครงรูปของสายเปปไทด์ที่เป็นเส้นใยยาว ไม่ละลายน้ำ และทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง ซึ่งทำหน้าที่แตกต่างไปจากโปรตีนที่มีรูปร่างกลม (globular protein) เช่น เอนไซม์ นอกจากนั้นคอลลาเจนมีลักษณะเหนียว มีแรงต้านแรงดึงสูงมาก เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของผิวหนัง 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*., 1989; Sivakumar *et al*., 2000) คอลลาเจนจากหอยเม่น (sea urchin) (Robinson, 1997; Cluzel *et al*., 2000) และคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิด *Cucumaria frondosa* และ *Stichopus japonicus* ซึ่งเป็นคอลลาเจน Type I พบว่าคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิด *C. frondosa* (Trotter *et al*., 1995) และ *S. japonicus*

(Cui *et al*., 2007) ประกอบด้วยสายเปปไทด์ 3 สาย [$(\alpha_1)_3$] แต่ใน *S. japonicus* ของ Saito และคณะ (2002) ประกอบด้วย $(\alpha_1)_2\ \alpha_2$

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 ไส้กรอกอิตาเลี่ยน snack sticks) เป็นต้น (Seneratne *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมกาว อุตสาหกรรมเครื่องหนังและฟิล์ม (Kittiphattanabawon *et al*., 2005)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้พยายามหาแหล่งคอลลาเจนจากสัตว์ทะเลชนิดใหม่ เพื่อมาทดแทนคอลลาเจนที่สกัดจากวัว ซึ่งมีความเสี่ยงและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) ในคน โดยปลิงทะเลเป็นสัตว์ทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่น่าสนใจในการนำมาสกัดคอลลาเจน และสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ปลิงทะเลชนิดต่างๆ ในประเทศไทยได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเลขาวและปลิงทะเลดำ
2. เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของวิธีการสกัด โดยศึกษาโปรตีนจากคอลลาเจนที่สกัดได้
3. เพื่อศึกษาชนิดของคอลลาเจนที่สกัดได้ โดยการตรวจสอบขนาดโมเลกุล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวารสาร

ขอบเขตของโครงการวิจัย

รวบรวมปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งจากเกาะปู อ. เหนือคลอง จ. กระบี่ จากนั้นทำการศึกษาเปรียบเทียบคอลลาเจนระหว่างปลิงทะเล 2 ชนิด โดยนำมาทำการสกัดคอลลาเจนจากผนังลำตัวของปลิงทะเล รวมทั้งทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ว่าเป็นโปรตีน 100% หรือไม่ด้วยการตรวจสอบโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford's method และตรวจสอบขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้ว่าเป็นคอลลาเจนชนิดใด

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)

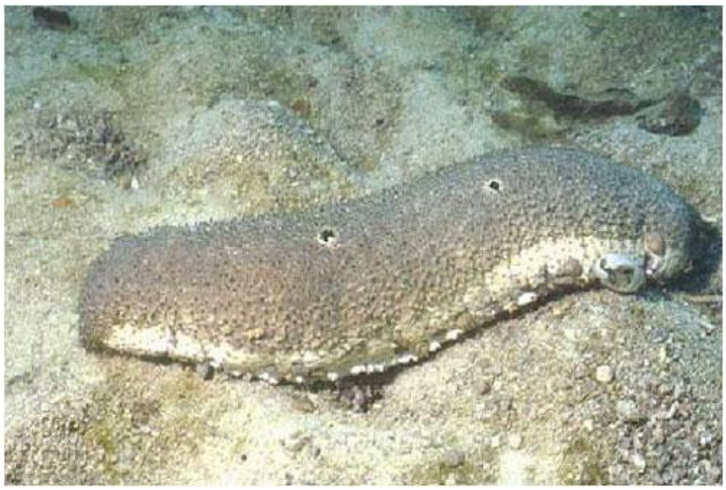
Genus *Holothuria* (*Metriatyla*) Rowe, 1969

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)



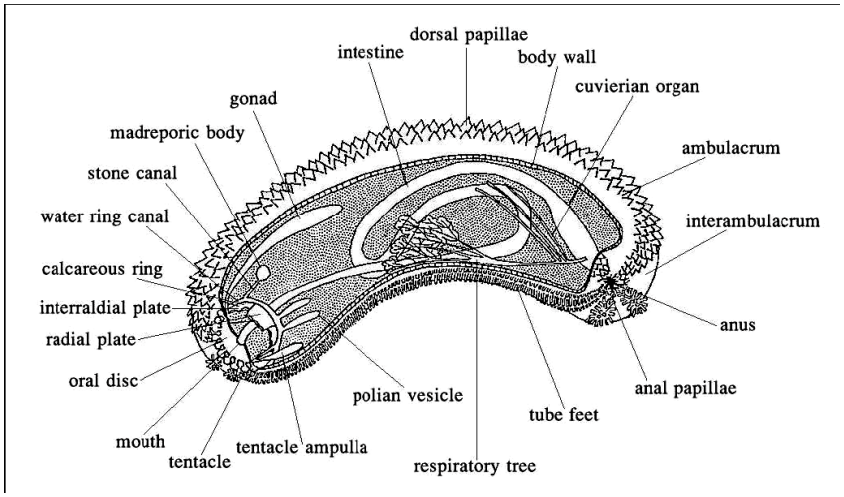
ภาพที่ 1. ปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*)

ที่มา: อารมณ์ (2558)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

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)

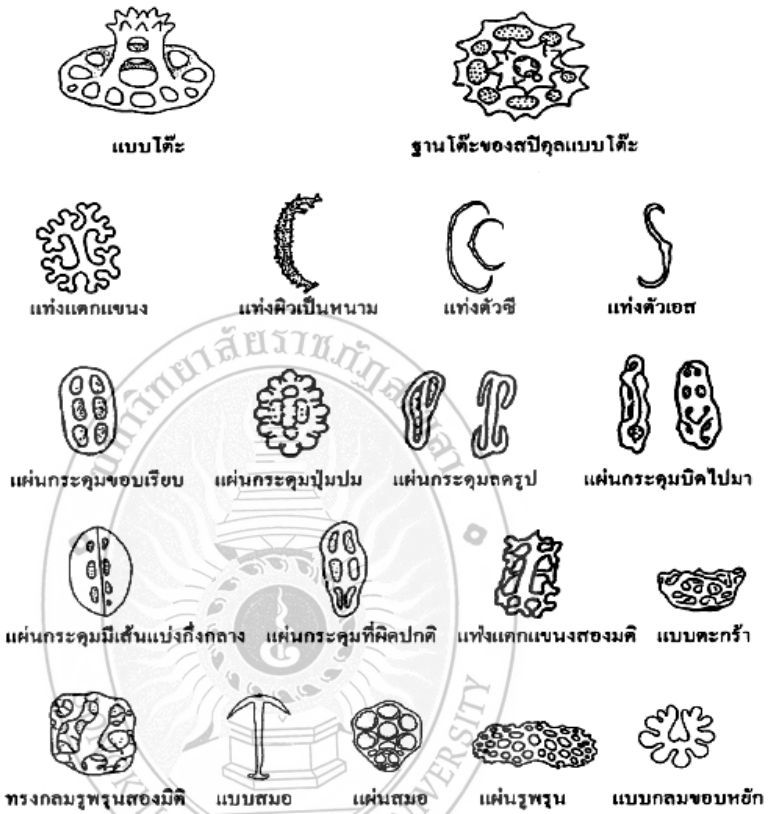
ปลิงทะเลมีการแลกเปลี่ยนก๊าซบริเวณผนังตัวที่บาง เช่น หนวดรอบปากและเท้าท่อ อวัยวะที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนก๊าซของปลิงทะเล มีลักษณะเป็นท่อแตกแขนงออกจากโคลเอกา (cloaca) คล้ายต้นพืช เรียกว่า เรสไปราทอรี่ทรี (respiratory tree) (ภาพที่ 7) อยู่สองข้างทางของทางเดินอาหาร ปลิงทะเลอันดับApodida จะไม่มีเรสไปราทอรี่ทรี 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 จะอาศัยการยืดหดของ

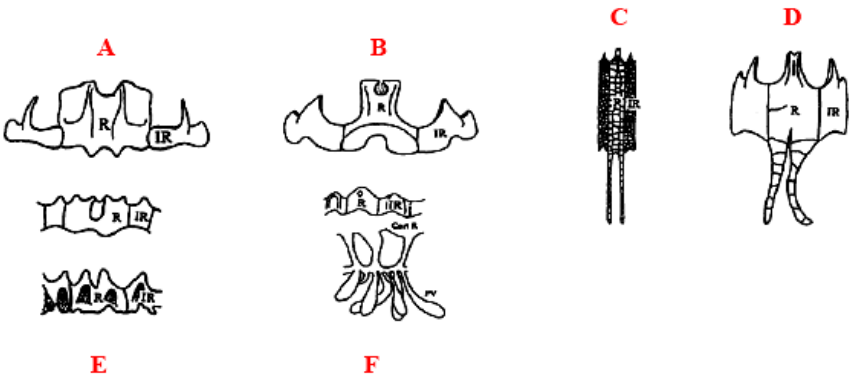
ผนังลำตัวร่วมกับการใช้สปิคุลรูปสมอเกาะไปตามพื้น ปลิงทะเลบางชนิด เช่น ปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) มีท่อปิดยาวเรียวงอกออกมาจากท่อหลักของเรสไปราทอรี่ทรี เรียกว่า ท่อคูเวียร์ (tubes of cuvier) ใช้ในการป้องกันตัว โดยการหดกล้ามเนื้อของผนังลำตัวอย่างรุนแรงทำให้ผนังด้านหลังของท่ออาหารตอนท้ายฉีกออกและเกิดแรงดัน 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 ปลิงทะเลบางชนิดสามารถอาศัยอยู่ในแหล่งที่อยู่ได้หลายรูปแบบ เช่น *Cucumaria curata* พบใน 3 แหล่งที่อยู่บริเวณชายฝั่งของแคลิฟอร์เนีย คือ แหล่งที่อยู่แรกจะพบนอนนิ่งๆ บริเวณชายหาดอย่างหนาแน่น แหล่งที่อยู่ที่สองจะพบรวมกันเป็นกลุ่มๆ ละ 5–20 ตัว ในบริเวณที่มีการเลี้ยงหอย (*Mytilus* bed) และแหล่งที่อยู่ที่สามจะอาศัยรวมตัวกันอยู่ใต้ก้อนหินซึ่งอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำขึ้นน้ำลง (midlittoral zone) (จรัสศรี และคณะ, 2551)



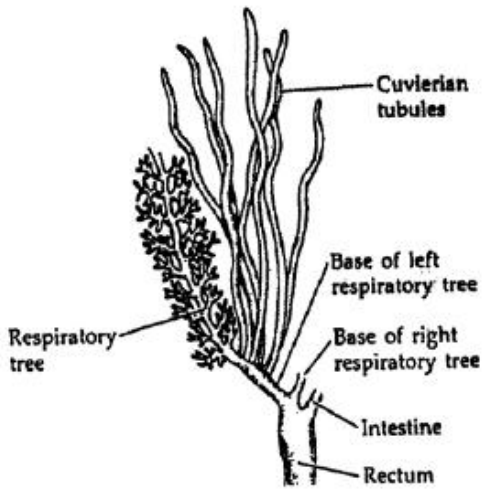
ภาพที่ 5. ลักษณะสปิคุลของปลิงทะเล

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% ไฮ ดรอกซีโพรลีน 11% และยังมีไฮดรอกซีไลซีน 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 ผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ [$Ca_5(PO_4)_3(OH)$] 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 ซึ่งคอลลาเจนจากวัวเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค 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 (Whang *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*., 1989; 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*) ในหนังปลา *Lagocephalus gloveri*, *Sebastes mentella* และ *Ctenopharyngodon idella* พบคอลลาเจน 64.2%, 54.3%, 47.5% และ 46.6% 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)

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 ชุดสำหรับทำโปรตีนอิเลคโตรโฟรีซิส แบบ Slab gel
8 ตู้เย็น -20°C
9 ตู้เย็น
10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
11 กล้องถ่ายรูป
12 เครื่องผสมสาร (vortex)
13 Shaker

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารเคมี

1 1 M HCl
2 0.1 M Acetic acid
3 0.2 M Acetic acid
4 0.5 M Acetic acid
5 0.1 M NaOH
6 $CuSO_4$ $5H_2O$
7 0.8 M NaCl
8 Tris-base
9 Tris-HCl
10 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0
11 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
12 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
13 porcine pepsin
14 0.02 M Na_2HPO_4, pH 8.0
15 Bovine serum albumin (BSA)
16 EDTA
17 10% (W/V) Sodium Dodecylsulfate
18 Acrylamide
19 Bisacrylamide
20 10% Ammonium Persulphate
21 2-mercaptoethanol
22 Glycerol
23 Bromophenol Blue
24 Methanol
25 Glycine
26 TEMED
27 Sodium Potassium Tartrate
28 Potassium iodide
29 95% ethanol

วิธีการทดลอง

ทำการศึกษาเปรียบเทียบคอลลาเจนระหว่างปลิงทะเล 2 ชนิด คือ ปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) โดยนำมาทำการสกัดคอลลาเจนจากผนังลำตัวของปลิงทะเล ศึกษาปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้ ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์จากการสกัดโดยศึกษาปริมาณโปรตีนในคอลลาเจน รวมทั้งศึกษาชนิดและขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้ ดังนั้นจึงมีการทดลอง 3 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเล

ทรีทเมนต์ที่ 1 ปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*)

ทรีทเมนต์ที่ 2 ปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

การทดลองที่ 2 ตรวจสอบความบริสุทธิ์จากการสกัด โดยศึกษาปริมาณโปรตีนในคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเล

ทรีทเมนต์ที่ 1 ปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*)

ทรีทเมนต์ที่ 2 ปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

การทดลองที่ 3 ตรวจสอบชนิดและขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเล

ทรีทเมนต์ที่ 1 ปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*)

ทรีทเมนต์ที่ 2 ปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

1. เก็บตัวอย่างและการสกัดคอลลาเจนจากปลิงทะเล (การทดลองที่ 1)

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 เมื่อถูกสัมผัสจะเคลื่อนไหวได้ช้าๆ

- เตรียม crude collagen fibril

กระบวนการทั้งหมดจะเตรียมที่อุณหภูมิ 4 ºC โดยนำปลิงทะเลขาว และปลิงดำแยกอวัยวะภายในออก รวมทั้งเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อภายในออกด้วย forcep จากนั้นตัดผนังลำตัวเป็นชิ้นเล็กๆ และล้างกับน้ำกลั่น นำตัวอย่างปลิงทะเลขาว 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 (Cui *et al*., 2007) จากนั้นนำ crude collagen fibril ทำการ lyophilize (ส่งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

- การสกัด pepsin-solubilize collagen

นำ crude collagen fibril ที่ผ่านการ lyophilize คนกับ 0.1 M NaOH (20 v/w) เป็นเวลา 3 วัน เพื่อย้ายส่วนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกไป และย้ายเอนไซม์ 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 ของ 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 (Cui *et al*., 2007) จากนั้นทำ lyophilize (ส่งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเล (การทดลองที่ 2)

- การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน (Standard curve)

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford's method หรือ Dye-binding method) อาศัยหลักการที่ว่าสาร Coomassie Brilliant Blue G-250 เมื่อจับกับโปรตีนแล้ว ทำให้เกิดการเปลี่ยนความยาวคลื่น (Wavelength) ของการดูดกลืนแสงจาก 465 nm (สีแดง) เป็น 595 nm (สีน้ำเงิน) วิธีแบรดฟอร์ดเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว จะมีความไวต่อการทดสอบสูงโดยสามารถตรวจสอบโปรตีน 5-100 μg (Bradford, 1976)

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีนโดยใช้สารละลาย BSA (Bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน จากนั้นนำสารละลาย BSA เติม Dye reagent เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 5-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในคอลลาเจนที่สกัดได้

เตรียมคอลลาเจนเพื่อนำมาวิเคราะห์โปรตีน โดยนำคอลลาเจนที่ผ่านการ lyophilize บดให้เป็นผงละเอียดด้วยโกร่งบด จากนั้นละลายด้วย 0.1 M acetic acid และปั่นคนให้เข้ากัน นำสารละลายคอลลาเจนที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford's method) และนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานโปรตีน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

3. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธี SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) (การทดลองที่ 3)

นำคอลลาเจนที่สกัดได้มาทำ SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli (1970) เพื่อวิเคราะห์หามวลโมเลกุลและแยกหน่วยย่อยของคอลลาเจน โดยใช้ 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel ใช้ตัวอย่างและตัวอย่างมาตรฐานคอลลาเจน ช่องละ 4 ไมโครลิตร เมื่อทำการรันเจลเสร็จจะย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant blue R-250

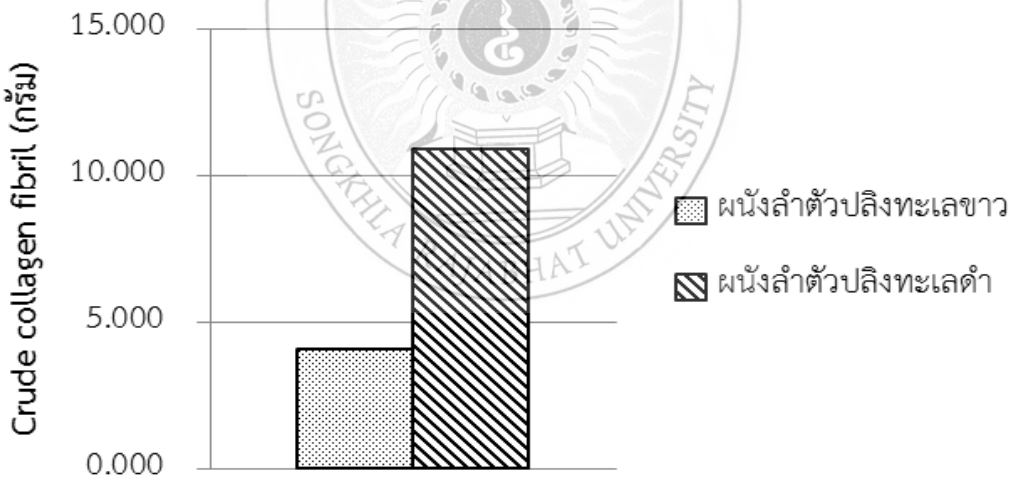
บทที่ 4

ผลการทดลองละวิจารณ์ผล

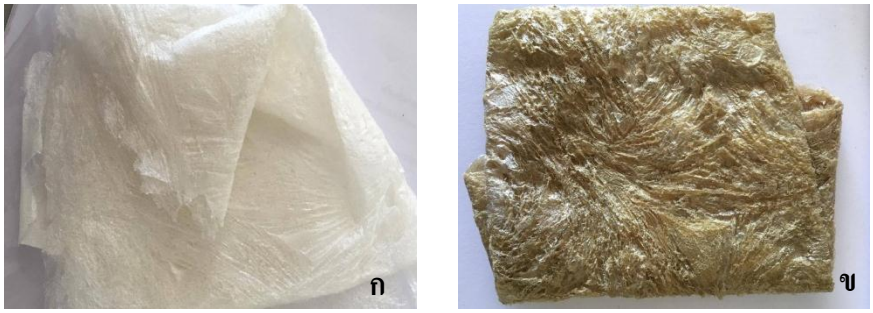
1. ผลการสกัดคอลาเจนจากปลิงทะเล

1.1 Crude Collagen Fibril

จากการทดลองการสกัดคอลลาเจนอย่างหยาบจากปลิงทะเล พบว่า ผนังลำตัวของปลิงทะเลขาวและผนังลำตัวของปลิงทะเลดำ 100 กรัมของน้ำหนักเปียก มีคอลลาเจนอย่างหยาบ 4.091 และ 10.955 กรัมของน้ำหนังแห้ง ตามลำดับ ซึ่งพบว่าคอลลาเจนอย่างหยาบที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลดำมีปริมาณมากกว่าปลิงทะเลขาว ดังแสดงในภาพที่ 8 และคอลลาเจนที่สกัดได้เป็นเนื้อคอลลาเจนแบบหยาบ เป็นแผ่นบาง เบา เหนียว ในผนังลำตัวปลิงทะเลขาวจะมีลักษณะสีขาวขุ่น แต่ในผนังลำตัวปลิงทะเลดำมีลักษณะสีน้ำตาล ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 8. น้ำหนักแห้งของคอลลาเจนอย่างหยาบ (Crude Collagen Fibril)



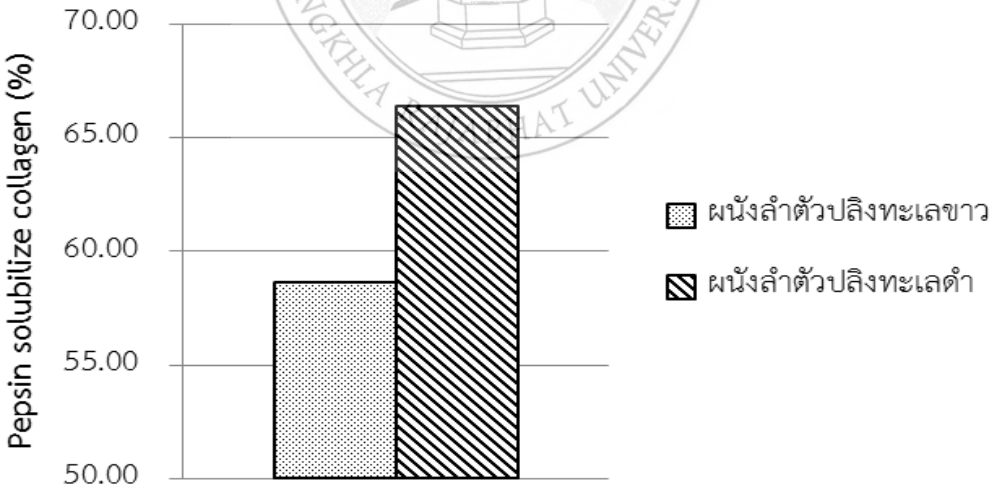
ภาพที่ 9. ลักษณะคอลลาเจนอย่างหยาบ (Crude Collagen Fibril)

ก. คอลลาเจนอย่างหยาบจากผนังลำตัวปลิงทะเลขาว

ข. คอลลาเจนอย่างหยาบจากผนังลำตัวปลิงทะเลดำ

1.2 pepsin-solubilize collagen (PSC)

จากการทดลองสกัด pepsin-solubilize collagen จากปลิงทะเล พบว่า ในผนังลำตัวของปลิงทะเลขาว และผนังลำตัวของปลิงทะเลดำ มี pepsin-solubilize collagen 58.70% และ 6.46% ตามลำดับ จากการสกัดต่อจาก Crude Collagen Fibril ซึ่ง pepsin-solubilize collagen จากปลิงทะเลดำ มีปริมาณมากกว่าปลิงทะเลขาว ดังแสดงในภาพที่ 10 และมีลักษณะเป็นเนื้อคอลลาเจนแบบละเอียดกว่า Crude Collagen Fibril ซึ่งในผนังลำตัวปลิงทะเลขาวจะมีลักษณะสีขาวครีม แต่ในผนังลำตัวของปลิงทะเลดำมีลักษณะสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 10. pepsin-solubilize collagen (%)

ภาพที่ 11. ลักษณะ pepsin-solubilize collagen

ก. คอลลาเจนอย่างหยาบจากผนังลำตัวปลิงทะเลขาว

ข. คอลลาเจนอย่างหยาบจากผนังลำตัวปลิงทะเลดำ

2. ผลการการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเล ด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

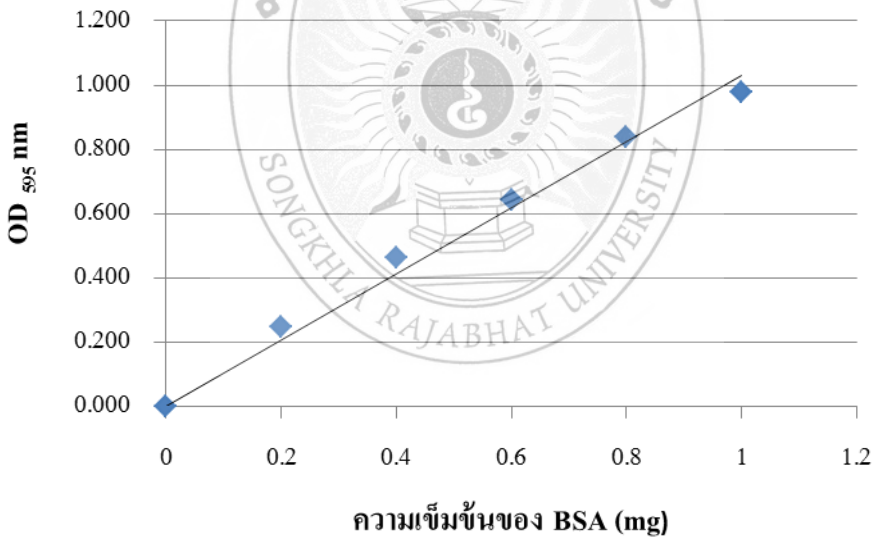
วิธีของแบรดฟอร์ด อาศัยหลักการที่ว่าสาร Coomassie Brilliant Blue G-250 เมื่อจับกับโปรตีนแล้ว ทำให้เกิดการเปลี่ยนความยาวคลื่น (Wavelength) ของการดูดกลื่นแสงจาก 465 nm (สีแดง) เป็น 595 nm (สีน้ำเงิน) Bradford's reagent เป็นสารประกอบของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งเตรียมในสารละลายกรด เช่น Phosphoric acid หรือ Perchloric acid

โดยความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA (มิลลิกรัม) และวัดค่า OD ที่ 595 นาโนเมตร ดังแสดงใน ตารางที่ 2 นำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ BSA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{595} จากกราฟมาตรฐานวัดค่าความชันเท่ากับ 1.3015 และค่า R^2 หรือ R-squared เท่ากับ 0.9886 และทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากคอลลาเจนที่สกัดได้ โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและเปรียบเทียบค่า OD ที่ 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 12)

ตารางที่ 2. ค่า OD $_{595}$ ของมาตรฐานโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

ค่าความเข้มข้นของ BSA (mg)	ค่า OD $_{595}$ เฉลี่ย
0	0.000
0.2	0.248
0.4	0.462
0.6	0.642
0.8	0.838
1	0.979

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 12. Standard curve ของวิธีแบรดฟอร์ดโดยมีค่า R^2 หรือ R-squared = 0.9886 และ y = 1.3015x

จากการหาปริมาณโปรตีนโดยคำนวณเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 3สรุปได้ว่าปริมาณโปรตีนแปรผันตามกับปริมาตรของสารที่สกัดได้

จากผนังลำตัวปลิงทะเลขาว ซึ่งมีโปรตีนเฉลี่ยเท่ากับ 0.052 มิลลิกรัม ในสารที่สกัดได้ 20 ไมโครลิตร ดังนั้นจากการเตรียมตัวอย่างคอลลาเจน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีโปรตีนในคอลาเจนที่สกัดได้เท่ากับ 2.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\text{คิดเป็นผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้ เท่ากับ} \quad \frac{\text{2.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}}{\text{1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}} \times 100 = 260\ \%$$

ดังนั้น pepsin-solubilize collagen ที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลขาว เป็นโปรตีนทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์

จากผนังลำตัวปลิงทะเลดำ ซึ่งมีโปรตีนเฉลี่ยเท่ากับ 0.116 มิลลิกรัม ในสารที่สกัดได้ 20ไมโครลิตร ดังนั้นจากการเตรียมตัวอย่างคอลลาเจน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีโปรตีนในคอลาเจนที่สกัดได้เท่ากับ 5.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\text{คิดเป็นผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้ เท่ากับ} \quad \frac{\text{2.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}}{\text{1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}} \times 100 = 580\ \%$$

ดังนั้น pepsin-solubilize collagen ที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลดำ เป็นโปรตีนทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์

จากการการสกัด pepsin-solubilize collagen (PSC) ด้วย 0.5 M acetic acid ร่วมกับ 1% pepsin ในผนังลำตัวปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) พบว่ามี 58.70% ซึ่งสอดคล้องกับคอลลาเจนจากหนังปลา Brown backed toadfish ที่มีปริมาณคอลลาเจน 54.3% ดังตารางที่ 4 (Senaratne *et al*., 2006) ส่วนผนังลำตัวปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) พบว่ามีคอลลาเจน 66.46% ซึ่งสอดคล้องกับคอลลาเจนหนังปลากดเมริกันที่มีคอลลาเจน 64.2% (Zhang *et al*., 2007) และผนังลำตัวปลิงทะเล *Bohadshia* spp. ที่มีคอลลาเจน 65% (Siddiqui *et al*., 2013) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3. ค่า OD_{595} ของคอลลาเจน pepsin-solubilize collagen (PSC) ที่สกัดได้จากปลิงทะเล

ชนิดปลิงทะเล	ปริมาณโปรตีนของคอลลเจนเมื่อเทียบจากกราฟมาตรฐาน (mg/ml)	ปริมาณโปรตีนของคอลลาเจนจริงที่ได้ (mg/ml)	ผลผลิตโปรตีนของคอลลาเจนที่สกัดได้ (%)
ผนังลำตัวปลิงทะเลขาว	0.052	2.6	260
ผนังลำตัวปลิงทะเลดำ	0.116	5.8	580

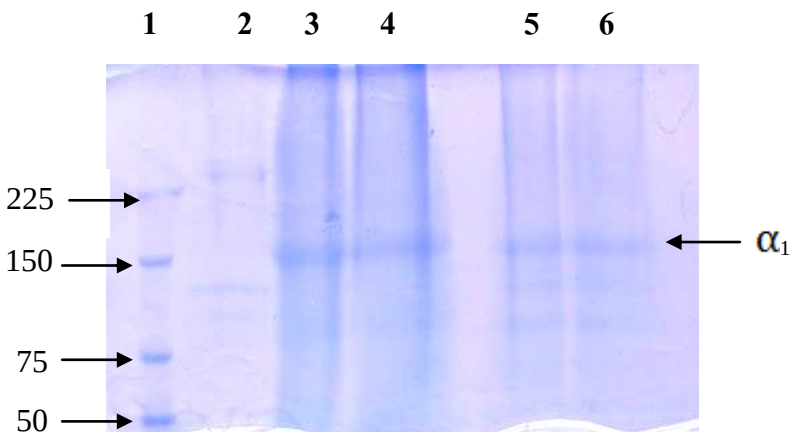
ตารางที่ 4. คอลลาเจนจากสัตว์น้ำชนิดต่างๆ

ชนิดสัตว์น้ำ	**วิธีการสกัด**	**ปริมาณของคอลลาเจน (%)**	**อ้างอิง**
หนังปลากดเมริกัน	0.5 M acetic acid 2 ครั้ง+ 1% pepsin	64.2	Zhang *et al*., 2007
หนังปลาเฉา	0.5 M acetic acid + 1% pepsin	46.6	Zhang *et al*., 2007
หนังปลา Brown backed toadfish	0.5 M acetic acid + 10% pepsin	54.3	Senaratne *et al*., 2006
หนังปลา Deep-sea redfish	0.5 M acetic acid 2 ครั้ง	47.5	Wang *et al*., 2007
ผนังลำตัวปลิงทะเล *Bohadshia* spp.	0.5 M acetic acid + 1% pepsin	65	Siddiqui *et al*., 2013
ผนังลำตัวปลิงทะเล *Holothuria parva*	0.5 M acetic acid + 1% pepsin	7	Adibzadeh *et al*., 2014
ผนังลำตัวปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*	0.5 M acetic acid + 1% pepsin	58.70	การศึกษาครั้งนี้
ผนังลำตัวปลิงทะเลดำ *Holothuria leucospilota*	0.5 M acetic acid + 1% pepsin	66.46	การศึกษาครั้งนี้

3. ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธี SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อดูขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้ ดังแสดงในภาพที่ 13 พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ทั้ง 2 ชนิด เป็นคอลลาเจน type I ที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ α_1 มีมวลโมเลกุลประมาณ 150 kDa ซึ่งแตกต่างจากคอลลาเจน type I จากปลาคาร์ฟในเลนที่ 2 ดังแสดงในภาพที่ 13

พบว่าขนาดมวลโมเลกุลของคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาว และปลิงทะเลดำ ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนจาก *Bohadschia* spp. และ *Parastichopus californicus* ที่มีขนาดมวลโมเลกุลของคอลลาเจน 138 kDa (Siddiqui *et al*., 2013; Liu *et al*., 2010) ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 13. แสดง SDS-PAGE ของสารละลายคอลลาเจน

ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 คือ สารละลายคอลลาเจนปลาคาร์ฟ 20 ไมโครลิตร

ช่องที่ 3 คือ สารละลายคอลลาเจนปลิงทะเลขาว 15 ไมโครลิตร

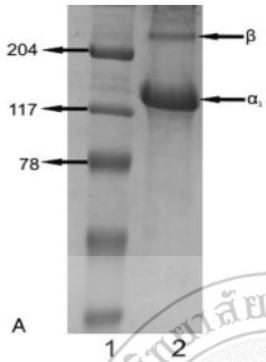
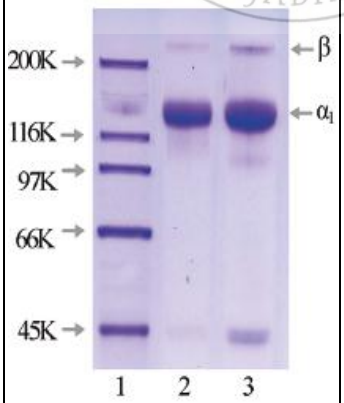
ช่องที่ 4 คือ สารละลายคอลลาเจนปลิงทะเลขาว 20 ไมโครลิตร

ช่องที่ 5 คือ สารละลายคอลลาเจนปลิงทะเลดำ 15 ไมโครลิตร

ช่องที่ 6 คือ สารละลายคอลลาเจนปลิงทะเลดำ 20 ไมโครลิตร

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 5. แสดงขนาดมวลโมเลกุล (kDa) ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิดต่างๆ

ชนิดปลิงทะเล	ภาพ SDS-PAGE	ชนิดคอลลาเจน	ขนาดมวลโมเลกุลของคอลลาเจน (kDa)	อ้างอิง
Stichopus vastus		type I	122	Abedin *et al.*, 2012
Bohadschia spp.		type I	138	Siddiqui *et al.*, 2013
Parastichopus californicus		type I	138	Liu *et al.*, 2010

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

pepsin-solubilize collagen (PSC) จากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) มีคอลลาเจน 58.70% จากการสกัดต่อจาก Crude Collagen Fibril ส่วน pepsin-solubilize collagen จากปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) มีคอลลาเจน 66.46% จากการสกัดต่อจาก Crude Collagen Fibril เมื่อนำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford's method พบว่าเป็นโปรตีน และนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของคอลลาเจนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ทั้ง 2 ชนิด เป็นคอลลาเจน type I ประกอบด้วยสายเปปไทด์ α_1 มีมวลโมเลกุลประมาณ 150 kDa ดังนั้นคอลลาเจนจากปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*) และปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) เป็นแหล่งคอลลาเจนอีกแหล่งหนึ่งที่สามารถใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่นด้านการแพทย์ ด้านเภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง ฯลฯ ซึ่งเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งแก่ผู้ผลิต

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดสอบอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมต่อไป

2. ควรทำการวิเคราะห์กรดอะมิโน เพื่อวิเคราะห์ว่ามีกรดอะมิโนชนิดใดอยู่บ้าง

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2558. ปลิงทะเลของไทย. แหล่งที่มา: http://www.nicaonline.com/index.php?option=com_content&view=article&id=546:2012-02-22-03-00-43&catid=42:2012-02-20-03-00-29&Itemid=124. 15 ธันวาคม 2558.

จรัสศรี อ๋างตันญา, วัชราภรณ์ ไตรพาณิชย์กุล, วัลลภา เกื้อด้วง, ศิรินทิพย์ สังข์จีน, ทัศนี จันทร์ดนตรี และไผทรัตน์ สิงห์ดำ. 2551. ตัวอย่างปลิงทะเลในพิพิธภัณฑ์สัตว์และพืชทะเล สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน. เอกสารเผยแพร่ กลุ่มพิพิธภัณฑ์ และสถานแสดงพันธุ์สัตว์และพืชทะเล ลำดับที่ 6. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน 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.

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.

อารมณ์ มุจรินทร์. 2558. มหัศจรรย์ "ปลิงทะเล" ดูดกินทรายแต่ไม่ดูดเลือด. แหล่งที่มา: http://www.manager.co.th/Science/ViewNews.aspx?NewsID=9530000111434.15 กรกฎาคม 2558.

Abedin, M.Z., Karim, A.A., Ahmed, F., Latiff, A.A., Gan, C-Y., Ghazali, F.C. and Sarker, M.Z.I. 2012. Isolation and characterization of pepsin-solubilized collagen from the integument of sea cucumber (*Stichopus vastus*). Journal of the Science of Food and Agriculture, Published online in Wiley Online Librar. Retrieved March 26, 2017, from http://www.wileyonlinelibrary.DOI10.1002/jsfa.5854.

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.

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.

Keng, W.L. 2013. The Real Residents of Telunas Beach, the Ecosystems of Telunas. Science & Environment. Available Source: http://www.telunascenter.com/science/real-residents-telunas-beach-ecosystems/. July 15, 2015.

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.

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.

Liu, Z., Oliveira, A. C. M. and Su, Y. C. 2010. Purification and Characterization of Pepsin-Solubilized Collagen from Skin and Connective Tissue of Giant Red Sea Cucumber (*Parastichopus californicus*). Journal of agricultural and food chemistry, 58(2): 1270-1274.

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

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.

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.

Purcell, S.W. 2014. Processing sea cucumbers into beche-de-mer: A manual for Pacific Island fishers. Southern Cross University, Lismore, and the Secretariat of the Pacific Community, Noumea. 44 p.

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

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.

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, 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.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมปลิงก่อนสกัดคอลาเจน

ภาพที่ 1. ล้างทำความสะอาดปลิงทะเลในน้ำให้สะอาด

ก. ปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*)

ข. ปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาพที่ 3. ผ่าผนังลำตัวปลิงทะเลเพื่อล้างทรายและแยกอวัยวะภายในออก

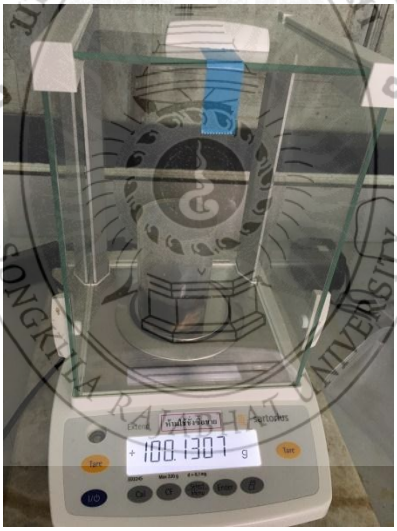
ก. ผ่าผนังลำตัวปลิงทะเลขาว

ข. อวัยวะภายในปลิงทะเลขาว

ค. ผ่าผนังลำตัวปลิงทะเลดำ

ง. อวัยวะภายในปลิงทะเลดำ

ภาพที่ 4. ตัดส่วนผนังลำตัวของปลิงทะเลเป็นชิ้นเล็ก ๆ

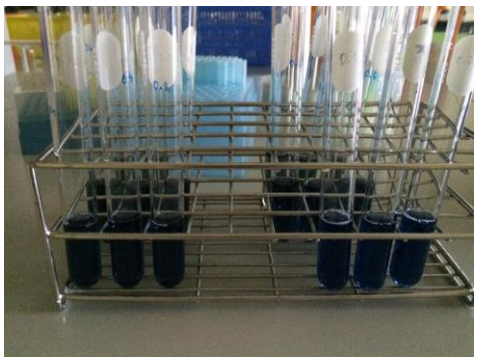


ภาพที่ 5. ชั่งน้ำหนัก

ภาคผนวก ข

วิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของคอลลาเจนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

ภาพที่ 1. เติมสารละลายแบรดฟอร์ด ในหลอดทดลอง ตั้งไว้ที่ทึบแสง 30 นาที



ภาพที่ 2. ใส่น้ำกลั่น และคอลลาเจน ตามความเข้มข้นที่กำหนด

ภาพที่ 3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสดง

ตารางที่ 1. แสดงค่า OD_{595} ของมาตรฐานโปรตีนวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford's method)

ค่าความเข้มข้นของ BSA(mg)	ค่า OD595			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าOD_{595} เฉลี่ย
0	0	0	0	0.000
0.2	0.261	0.243	0.240	0.248
0.4	0.476	0.458	0.453	0.462
0.6	0.653	0.632	0.641	0.642
0.8	0.855	0.828	0.832	0.838
1	0.950	0.992	0.995	0.979

ตารางที่ 2. แสดง OD_{595} ของคอลลาเจนที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลขาว

ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลขาว (ul)	ค่า OD_{595}			ค่าOD_{595} เฉลี่ย	ปริมาณโปรตีนของคอลลาเจนเมื่อเทียบจากกราฟมาตรฐาน (mg)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0	0	0	0.000	0.000
20	0.061	0.062	0.038	0.054	0.052
40	0.117	0.140	0.123	0.127	0.123
60	0.159	0.145	0.155	0.153	0.148
80	0.185	0.178	0.178	0.180	0.175
100	0.198	0.216	0.208	0.207	0.201

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสารที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลขาว ใช้สูตร y = mx ซึ่งในที่นี้คือ y = 1.0315x สามารถคำนวณได้ดังนี้

คอลลาเจน 20 ไมโครลิตร $\rightarrow$ $x = \frac{0.054}{1.0315} = 0.052$ มิลลิกรัม

คอลลาเจน 40 ไมโครลิตร $\rightarrow$ $x = \frac{0.127}{1.0315} = 0.123$ มิลลิกรัม

คอลลาเจน 60 ไมโครลิตร $\rightarrow x = \frac{0.153}{1.0315} = 0.148$ มิลลิกรัม

คอลลาเจน 80 ไมโครลิตร $\rightarrow x = \frac{0.180}{1.0315} = 0.175$ มิลลิกรัม

คอลลาเจน 100 ไมโครลิตร $\rightarrow x = \frac{0.207}{1.0315} = 0.201$ มิลลิกรัม

ตารางที่ 3. แสดง OD_{595} ของคอลลาเจนที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลดำ

ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลดำ (ul)	ค่า OD_{595}				ปริมาณโปรตีนของคอลลาเจนเมื่อเทียบจากกราฟมาตรฐาน (mg)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าOD_{595} เฉลี่ย	
0	0	0	0	0.000	0.000
20	0.113	0.126	0.120	0.120	0.116
40	0.151	0.175	0.157	0.161	0.156
60	0.218	0.217	0.231	0.222	0.215
80	0.277	0.244	0.242	0.254	0.247
100	0.335	0.309	0.361	0.335	0.325

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสารที่สกัดได้จากผนังลำตัวปลิงทะเลดำ ใช้สูตร y = mx ซึ่งในที่นี้คือ y = 1.0315x สามารถคำนวณได้ดังนี้

คอลลาเจน 20 ไมโครลิตร $\rightarrow x = \frac{0.120}{1.0315} = 0.116$ มิลลิกรัม

คอลลาเจน 40 ไมโครลิตร $\rightarrow x = \frac{0.161}{1.0315} = 0.156$ มิลลิกรัม

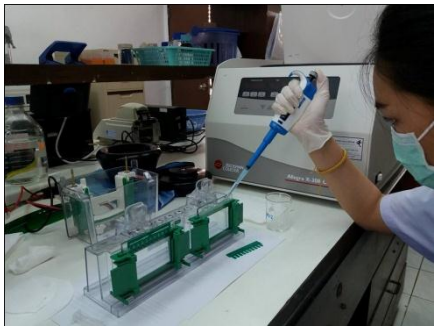
คอลลาเจน 60 ไมโครลิตร $\rightarrow x = \frac{0.222}{1.0315} = 0.215$ มิลลิกรัม

คอลลาเจน 80 ไมโครลิตร $\rightarrow x = \frac{0.254}{1.0315} = 0.247$ มิลลิกรัม

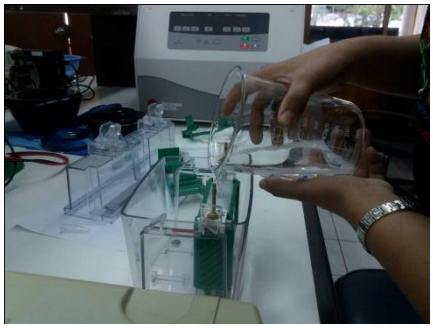
คอลลาเจน 100 ไมโครลิตร $\rightarrow x = \frac{0.335}{1.0315} = 0.325$ มิลลิกรัม

ภาคผนวก ค

วิธีการแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

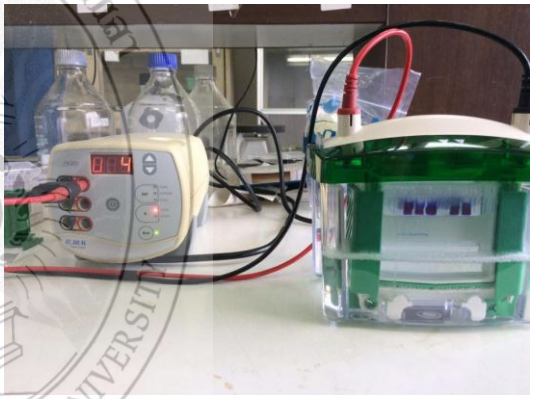


ภาพที่ 1. เตรียมเจล



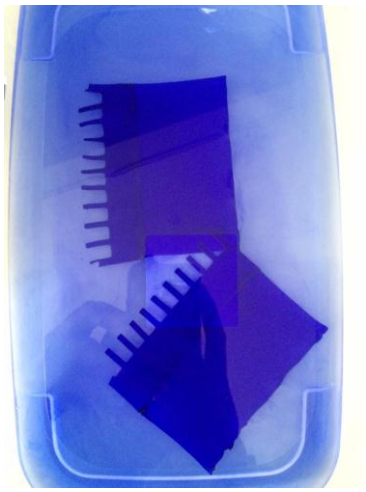
ภาพที่ 2. นำเจลลงไปในแทงค์ พร้อมใส่ electrode buffer

ภาพที่ 3. ถอด comb ออก พร้อมโหลดตัวอย่าง



ภาพที่ 4. เสียบกับ power supply และรันเจล

ภาพที่ 5. นำเจลย้อมสี 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 6. ล้างเจล

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. 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.

2. 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)