สมบัติของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด

Characterisation of Acid-Soluble Collagen from Skin of Grey Featherback (*Notopterus notopterus*)

นรินทร์ ทาหอม และวรางคณา สมพงษ์*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narin Thahom and Warangkana Sompongse*

Department of Food Science and Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อเพิ่มมูลค่าของหนังปลาสลาด (*Notopterus notopterus*) ซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งจากการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาบด โดยนำมาผลิตเป็นคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาสลาด พบว่ามีปริมาณความชื้นร้อยละ 62.42±1.40 โปรตีน 34.19±1.22 ไขมัน 0.81±0.24 และเถ้า 1.01±0.42 โดยน้ำหนักสด การศึกษาการสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด โดยใช้ 0.5 M acetic acid นาน 72 ชั่วโมง ได้ปริมาณผลผลิตร้อยละ 38.25±2.30 โดยน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วยไฮดรอกซีโปรลีนร้อยละ 63.37 (w/w) โดยน้ำหนักคอลลาเจนแห้ง มีค่า transition temperature (T_{max}) เท่ากับ 33.15±0.03 °C สามารถดูดกลืนแสงยูวีสูงสุดที่ความยาวคลื่น 233 nm มีค่าการละลายสูงสุดที่ pH 1 ใน 0.5 M acetic acid มีค่าการละลายลดลงในช่วง pH 6-8 และความเข้มข้นของ NaCl สูงกว่าร้อยละ 2 (w/v) และจาก FTIR spectra พบว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดมีโครงสร้างเกลียวสามสายประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีน โปรลีน และไฮดรอกซีโปรลีนร้อยละ 33.7, 11.3 และ 7.5 ตามลำดับ

คำสำคัญ : ปลาสลาด; หนังปลา; การสกัด; คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด

Abstract

The objective of this research was to increase value of skin of grey featherback (*Notopterus notopterus*) that was the waste from the food processing by extraction of acid soluble collagen. Chemical composition of skin of grey featherback was 62.42±1.40 % moisture, 34.19±1.22 % protein, 0.81±0.24 % fat and 1.01±0.42 % ash by wet weight. acid-soluble collagen (ASC) was extracted in 0.5 M acetic acid for 72 hours and yield was 38.25±2.30 % by dry weight. It was

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** wsompongse@hotmail.com

composed of 63.37 % (w/w) hydroxyproline by ASC dry weight. ASC exhibited transition temperature (T_{max}) at 33.15±0.03 °C and maximum UV absorbance at 233 nm. ASC had the highest solubility in 0.5 M acetic acid at pH 1. The solubility was decreased in the interval of pH 6-8 and at the concentration of NaCl more than 2 % (w/v). FTIR analysis showed the existence of helical arrangements of collagen. ASC was composed of 33.7 % glycine, 11.3 % proline and 7.5 % hydroxyproline.

Keywords: grey featherback; fish skin; extraction; acid-soluble collagen

1. บทนำ

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่อยู่ภายนอกเซลล์ มีขนาดใหญ่ และพบปริมาณมากประมาณร้อยละ 30 ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์ทุกชนิด ซึ่งประกอบด้วย polypeptide 3 สาย ที่เรียกว่า α-chain ในแต่ละสายประกอบด้วยลำดับการเรียงซ้ำ ๆ กันของ tripeptide base (Gly-X-Y) คอลลาเจนมีไกลซีนเป็นกรดอะมิโนหลัก นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยโปรลีนและไฮดรอก-ซีโปรลีน ซึ่งเป็นกรดอิมิโนที่มักพบในคอลลาเจน พันธะที่พบมากและมีความสำคัญต่อความคงตัวของคอลลาเจนคือ พันธะไฮโดรเจน [1]

แต่เดิมแหล่งที่นิยมใช้ในการสกัดคอลลาเจนได้มาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ หมู วัว เป็นต้น แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดทางศาสนา การแพร่ระบาดของโรคไข้สมองอักเสบที่เกิดจากวัว และโรคปากและเท้าเปื่อย [2] ส่งผลให้มีการศึกษาเพื่อหาแหล่งใหม่ในการสกัดคอลลาเจน ซึ่งพบว่าหนังปลาเป็นแหล่งทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ และเป็นการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งของอุตสาหกรรมสัตว์น้ำอีกด้วย Kittiphattanabawon และคณะ [3] พบว่าหนังปลา bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) มีปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 10.94 ในขณะที่ Zeng และคณะ [4] พบว่าหนังปลา Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) มีปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 39 นอกจากนี้ Duan และคณะ [5] พบว่า หนังปลา carp (*Cyprinus carpio*) มีปริมาณคอลลาเจนร้อยละ 41.3

ปลาสลาด (*Notopterus notopterus*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับปลากราย (*Notopteridae*) จัดเป็นปลาที่มีขนาดเล็กที่สุดในสกุลนี้เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง นิยมนำเนื้อไปทำทอดมันแทนเนื้อปลากราย เนื่องจากปลากรายมีราคาแพงและหายากกว่า [6] แหล่งที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจายในประเทศพบว่า ปลาสลาดอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืดทั่วทุกภาคของไทย [7] จึงมีแนวคิดที่จะนำหนังปลาสลาดซึ่งเป็นปลาที่มีหนังเหนียวและเป็นเศษเหลือทิ้งที่มีมูลค่าต่ำ นอกจากนี้ยังหาง่ายในจังหวัดปทุมธานี ซึ่งเป็นแหล่งทางเลือกใหม่ในการสกัดคอลลาเจนเพื่อใช้ทดแทนคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการนำหนังปลาสลาดมาใช้ในการสกัดคอลลาเจนด้วยกรด และศึกษาสมบัติของคอลลาเจนที่สกัดได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัตถุดิบ

หนังปลาสลาดซื้อจากตลาดไท จังหวัดปทุมธานี นำมาทำความสะอาด โดยการขูดเศษเนื้อและเกล็ด ตัดให้มีขนาด 0.5 x 0.5 cm เก็บที่อุณหภูมิ -18 °C จนกว่าจะนำมาใช้

2.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาสลาด

นำหนังปลาสลาดมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า [8]

2.3 ศึกษาการสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด

สกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดด้วยวิธีดัดแปลงจากวิธีการของ Zeng และคณะ [4] การสกัดทั้งหมดทำภายใต้อุณหภูมิ 4 °C โดยแช่หนังในสารละลาย 0.1 M NaOH อัตราส่วน 1:80 (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พร้อมกวนเบา ๆ ตลอดเวลา เปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 3 ชั่วโมง เพื่อนำส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนคอลลาเจนและเม็ดสีออก หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่า pH ของน้ำล้างเป็นกลาง แล้วนำมาแช่ในสารละลาย 0.5 M acetic acid อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย 1 : 50 (w/v) พร้อมกับการกวนอย่างเบา ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมไปหมุนเหวี่ยงที่ 21,200 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนโดยการเติม NaCl ให้ได้ความเข้มข้นของ NaCl สุดท้ายที่ 2.6 M แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 21,200 xg เป็นเวลา 40 นาที เก็บตะกอนเจลสีขาวขุ่นมาละลายกลับด้วยสารละลาย 0.5 M acetic acid ปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนักตะกอน หลังจากนั้นนำไป dialysed ด้วย 0.1 M acetic acid ปริมาตร 10 เท่าของสารใน dialysis tube เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสาร ละลายทุก ๆ 4 ชั่วโมง ต่อมานำสารละลายที่ได้ไป dialysed ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 เท่า โดยเปลี่ยนน้ำจนกว่าจะได้ pH เป็นกลาง นำสารที่ได้จากการ dialysed ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และตัวอย่างคอลลาเจนที่ได้จากการทำแห้งเรียกว่า ASC (acid-soluble collagen) คำนวณปริมาณคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด และรายงานในรูปของน้ำหนักฐานแห้งต่อน้ำหนักฐานแห้งของหนังปลาสลาด

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีน

โดยย่อยตัวอย่างคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดโดยใช้ 6 N HCl ที่อุณหภูมิ 110 °C นาน 18 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนด้วยเครื่อง high-performance liquid chromatography spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่น 265 nm ตามวิธีของ Hutson และคณะ [9] และรายงานปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนเป็นร้อยละโดยน้ำหนักคอลลาเจนแห้ง

2.5 วิเคราะห์ความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน

วิเคราะห์ค่า transition temperature (T_{max}) ด้วยเครื่อง differential scanning calorimeter (DSC) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ [10] นำ ASC มาละลายในสารละลาย 0.05 M acetic acid ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย 1 : 40 (w/v) ตั้งสารละลายทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ 4 °C วิเคราะห์โดยเครื่อง DSC วัดการถ่ายเทความร้อนของคอลลาเจน การวัดอุณหภูมิทำโดยใช้ indium thermogram ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน 30-40 mg ใส่ลงใน aluminium pan แล้วปิดผนึก จากนั้นนำมา scan ในช่วงอุณหภูมิ 20-50 °C อัตราการให้ความร้อน 5 K/min ใช้จานเปล่าที่ปิดผนึกเป็นตัวอย่างอ้างอิง ประเมินค่า T_{max} จากจุด peak ของกราฟ DSC transition curve

2.6 วิเคราะห์สมบัติการดูดกลืนแสงยูวี

เตรียมตัวอย่างโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Ahmad และ Benjakul (2010) [10] และ Zeng และคณะ (2009) [4] กล่าวคือ ชั่ง ASC 0.01 กรัม ละลายใน 0.5 M acetic acid 10 ml ใส่สารละลายลงใน quartz cell วิเคราะห์สมบัติการดูดกลืนแสงยูวีด้วยเครื่อง UV/visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 190-400 nm

2.7 ความสามารถในการละลายของคอลลาเจน (Solubility) [10]

2.7.1 ผลของ pH ต่อความสามารถในการละลายของคอลลาเจน

เตรียมสารละลาย ASC ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3 mg/ml ด้วย 0.5 M acetic acid ปรับ pH ด้วย 6 M NaOH หรือ 6 M HCl เพื่อให้ pH สุดท้ายอยู่ระหว่าง 1-10 และปรับปริมาตรของสารละลายตัวอย่างเป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 °C วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใสด้านบนโดยวิธีของ Lowry และคณะ โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน [12]

2.7.2 ผลของระดับความเข้มข้น NaCl ต่อการละลายของคอลลาเจน

เตรียมสารละลาย ASC ใน 0.5 M acetic acid ที่ pH 3 จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 6 mg/ml ผสม NaCl ใน 0.5 M acetic acid 5 ml ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ร้อยละ 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 (w/v)) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ NaCl เป็นร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 (w/v) แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 °C วัดปริมาณของโปรตีนในสารละลายใสส่วนบนโดยวิธีของ Lowry และคณะ โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน [12]

รายงานค่าความสามารถในการละลายของคอลลาเจน เป็นร้อยละความสามารถในการละลายสัมพัทธ์ของคอลลาเจน (% relative collagen solubility) เมื่อกำหนดให้สภาวะที่คอลลาเจนมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 750 nm มีค่าความสามารถในการละลายของคอลลาเจนเท่ากับร้อยละ 100

2.8 วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน

นำ ASC ไป hydrolysed ใน 6 N HCl ที่ 110 °C นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง Hitachi Amino Acid Analyzer รุ่น L-8500A ใช้ระบบ lithium buffer และคำนวณองค์ประกอบของกรดอะมิโนเป็นส่วนใน 1,000 ส่วนของปริมาณทั้งหมด [13]

2.9 วิเคราะห์โครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน

ชั่ง ASC 0.2 mg ผสมกับ potassium bromide (KBr) 10 mg บรรจุในจานกลมภายใต้สภาวะแห้ง และทำการวิเคราะห์โครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจนด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrometer ที่ wave number 4000 ถึง 400 cm^{-1} โดยใช้อัตราการบันทึกข้อมูล 2 cm^{-1} ต่อจุด [11]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 องค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาสลาด

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาสลาด พบว่ามีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าร้อยละ 62.42±1.40, 34.19±1.22, 0.81±0.24, 1.01±0.42 โดยน้ำหนักสด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาสลาด

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละโดยน้ำหนักสด*
ความชื้น	62.42±1.40
โปรตีน	34.19±1.22
ไขมัน	0.81±0.24
เถ้า	1.01±0.42

*แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

องค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เช่น หนังปลา bigeye snapper *(Priacanthus hamrur)* มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าร้อยละ 52.8, 25.2, 1.02 และ 2.02 โดยน้ำหนักสด ตามลำดับ [14] หนังปลา Nile perch (*Lates niloticus*) มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าร้อยละ 72.7, 20.3, 4.96 และ 3.7 โดยน้ำหนักสด ตามลำดับ [15]

3.2 การสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด

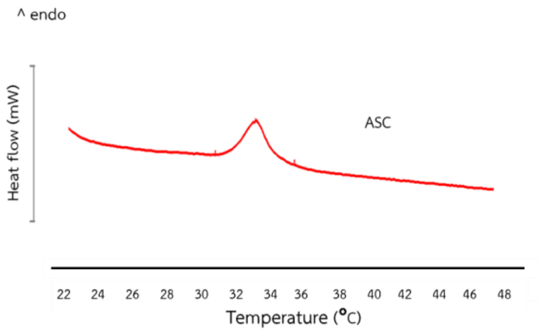
การสกัดคอลลาเจนด้วย 0.5 M acetic acid นาน 72 ชั่วโมง ที่ 4 °C ได้ปริมาณผลผลิตร้อยละ 38.25±2.30 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตที่สกัดได้กับหนังปลาชนิดอื่น พบว่าปริมาณผลผลิตที่ได้ใกล้เคียงกับหนังปลา Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) ซึ่งได้ปริมาณผลผลิตร้อยละ 39.4 [4] แต่น้อยกว่าหนังปลา Japanese sea-bass (*Lateolabrax japonicas*) (ร้อยละ 51.4) หนังปลา chub mackerel (*Scomber japonicas*) (ร้อยละ 49.8) และหนังปลา bullhead shark (*Heterodontus japonicas*) (ร้อยละ 50.1) [16] อาจเนื่องมาจากชนิด พันธุ์ พฤติกรรม ภูมิอากาศ และถิ่นอาศัยของปลาที่แตกต่างกัน

3.3 ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีน

ผลการวิจัยพบว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดประกอบด้วยไฮดรอกซีโปรลีนเท่ากับ ร้อยละ 63.37 โดยน้ำหนักคอลลาเจนแห้ง ค่าที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงความบริสุทธ์ของคอลลาเจนที่สกัดได้ และไฮดรอกซีโปรลีนเป็นกรดอิมิโนที่พบเฉพาะในคอลลาเจน นอกจากนี้ ไฮดรอกซีโปรลีนมีบทบาทสำคัญต่อความความคงตัวของโครงสร้างเกลียวสามสาย เนื่องจากไฮดรอกซีโปรลีนมีตำแหน่งไฮดรอกซิลที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ และวงแหวน pyrrolidine ที่ป้องกันการหมุนของพันธะหรือโครงสร้างของคอลลาเจน [17]

3.4 ความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน

อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจนซึ่งรายงานเป็นค่า T_{max} พบว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดมีค่า T_{max} เท่ากับ 33.15±0.03 °C (รูปที่ 1)



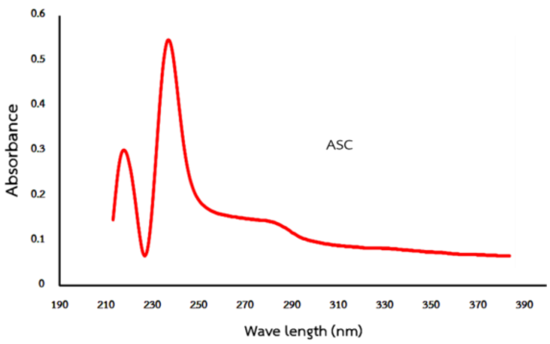
รูปที่ 1 DSC thermogram ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด

โดยค่า T_{max} ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดมีค่าใกล้เคียงกับหนังปลา Nile tilapia (T_{max} เท่ากับ 32 °C) แต่มีค่าน้อยกว่าหนังลูกวัว (T_{max} เท่ากับ 44 °C) [4] อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของกรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโน และการจัดเรียงโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจนของปลาแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนมีผลโดยตรงต่อความคงตัวของคอลลาเจนต่อความร้อน Giraud-Guille และคณะ [18] ได้สกัดคอลลาเจนจากหนังลูกวัวและหนังปลา flat fish (*Soleidae*) พบว่าค่าอุณหภูมิในการเสียสภาพของหนังลูกวัว (44.6 °C) สูงกว่าหนังปลา flat fish (37.5 °C) ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีน โดยหนังลูกวัวมีปริมาณโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีน เท่ากับ

121 และ 94 ส่วนใน 1,000 ส่วน ตามลำดับ สูงกว่าหนังปลา flat fish มีปริมาณโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนเท่ากับ 104 และ 59 ส่วนใน 1,000 ส่วน ตามลำดับ [18] จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังสัตว์ที่มีโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนในปริมาณมาก พบว่ามีอุณหภูมิในการเสียสภาพสูงขึ้นหรือความคงตัวต่อความร้อนเพิ่มขึ้น

3.5 สมบัติการดูดกลืนแสงยูวี

คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดถูกสแกนในช่วงความยาวคลื่น 190-400 nm โดยคอลลาเจนสามารถดูดกลืนแสงยูวีสูงสุดที่ความยาวคลื่น 233 nm ดังแสดงในรูปที่ 2 เนื่องจากคอลลาเจนมีปริมาณของกรดอะมิโนชนิด ฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน และไทโรซีนในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Zeng และคณะ [4] จากสมบัติการดูดกลืนยูวีนี้สามารถใช้แยกคอลลาเจนออกจากโปรตีนชนิดอื่นได้ โดยโปรตีนชนิดอื่นส่วนใหญ่ดูดกลืนแสงยูวีสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 nm

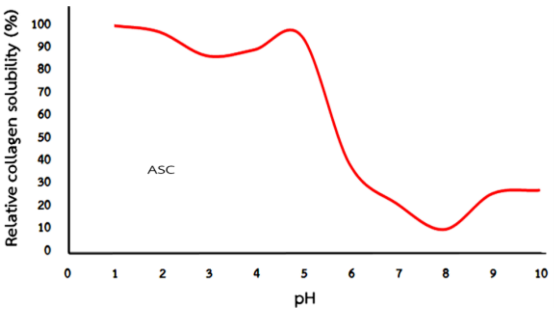


รูปที่ 2 UV spectrum ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด

3.6 ความสามารถในการละลายของคอลลาเจน

3.6.1 ผลของ pH ต่อความสามารถในการละลายของคอลลาเจน

ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดที่สภาวะ pH แตกต่างกัน แสดงในรูปที่ 3 คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดสามารถละลายได้มากในช่วง pH 1-5 มีค่าการละลายสูงสุดที่ pH 1 และค่าการละลายลดลงอย่างชัดเจนในช่วง pH 6-8 ที่ pH สูงกว่า 8 คอลลาเจนมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Foegeding และคณะ [19] พบว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลา Nile tilapia มีค่าการละลายน้อยที่สุดในช่วง pH 6-9



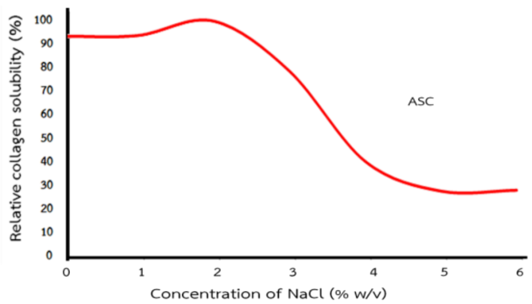
รูปที่ 3 ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดที่ pH แตกต่างกัน

จากการศึกษาของ Vojdani [20] พบว่าเมื่อ pH น้อยกว่าและมากกว่าค่า pI (isoelectric point) ส่งผลให้โปรตีนมีผลรวมของประจุสุทธิเป็นบวกและลบ ตามลำดับ จึงเกิดแรงผลักกันระหว่างประจุ (electrostatic repulsion) ของโปรตีน ทำให้เกิดการละลายและคงตัวในสารละลายนั้นได้ ในทางกลับกันถ้า pH เข้าใกล้หรือเท่ากับ pI ส่งผลให้โปรตีนมีผลรวมของประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงไม่เกิดแรงผลักกันระหว่างประจุของโปรตีน ทำให้เกิดการรวมกลุ่มกันด้วยแรง hydrophobic-hydrophobic interaction และตกตะตอนในที่สุด [18] ดังนั้น pI

ของคอลลาเจนจากหนังปลาสลาดอยู่ในช่วง 6-8 ซึ่งสอดคล้องกับ pI ของคอลลาเจนจากหนังปลา Nile tilapia ที่อยู่ในช่วง pH 6-9 [19]

3.6.2 ผลของระดับความเข้มข้นของ NaCl ต่อความสามารถในการละลายของคอลลาเจน

ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดที่ pH 3 ในสภาวะความเข้มข้นของ NaCl แตกต่างกัน แสดงในรูปที่ 4 คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดมีค่าการละลายสูงสุดที่ความเข้มข้นของ NaCl ร้อยละ 1 (w/v) และค่าการละลายลดลงอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของ NaCl มีค่าสูงกว่าร้อยละ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Zeng และคณะ [4] พบว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลา Nile tilapia มีค่าการละลายลดลงอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของ NaCl มีค่าสูงกว่าร้อยละ 2



รูปที่ 4 ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดที่ความเข้มข้นของ NaCl แตกต่างกัน

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าในช่วงที่ความเข้มข้นของ NaCl น้อยกว่าร้อยละ 2 (w/v) ที่ pH 3 คอลลาเจนสามารถละลายได้ดี เนื่องมาจากในช่วงนี้เกลือทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้น้ำมาล้อมรอบโมเลกุลคอลลาเจนมากขึ้น ส่งผลให้คอลลาเจนจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดีขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของ NaCl สูงกว่าร้อยละ 2 (w/v) ที่ pH 3 คอลลาเจนมีความสามารถในการละลายลดลง และอาจตกตะกอน เป็นผลมาจาก ionic strength มีค่าสูงขึ้น จึงเกิดการแย่งจับน้ำระหว่างไอออนของเกลือและโมเลกุลคอลลาเจน ร่วมกับเกิด hydrophobic interaction ระหว่างโมเลกุลคอลลาเจนอีกด้วย [21]

3.7 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

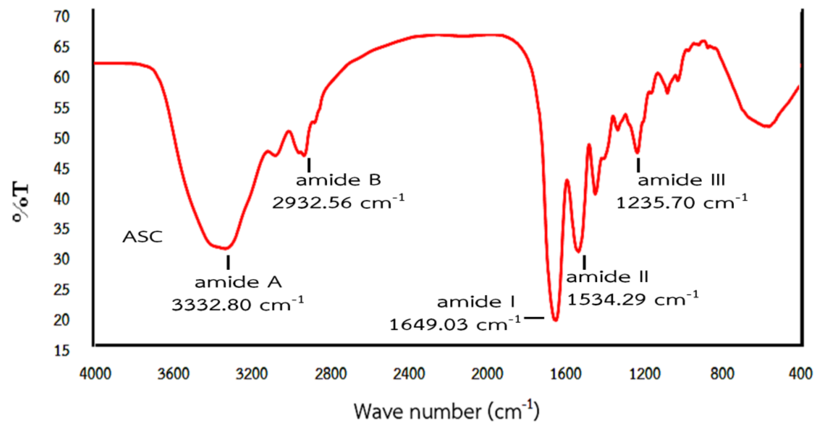
คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดประกอบด้วยกรดอะมิโน แสดงเป็นส่วนใน 1,000 ส่วนของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด ในตารางที่ 2 จากผลการวิจัยพบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ได้ มีไกลซีนในปริมาณมากถึงร้อยละ 33.7 (337 ส่วนในกรดอะมิโน 1,000 ส่วน) โดยปกติพบไกลซีนในทุก ๆ สามหน่วยย่อยของลำดับอะมิโน (Gly-X-Y) ในโมเลกุลคอลลาเจน [1] กรดอิมิโนที่มักพบในคอลลาเจน คือ โปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีน โดยมีปริมาณรวมกันที่ร้อยละ 18.8 (188 ส่วนใน 1,000 ส่วน) เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดอะมิโนกับหนังปลาชนิดอื่น พบว่ามีโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนใกล้เคียงกับหนังปลา carp (*Cyprinus carpio*) (190 ส่วนใน 1,000 ส่วน) [5] แต่มากกว่าหนังปลา ocellate puffer (*Takifu gurubripes*) (170 ส่วนใน 1,000 ส่วน) [22] โดยปริมาณของโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนสัมพันธ์กับชนิด พฤติกรรม และถิ่นอาศัยของปลา [19] นอกจากนี้ปริมาณของโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนยังสัมพันธ์โดยตรงกับความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจนอีกดังที่ได้กล่าวไปในข้อ 3.4

3.8 โครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน

จาก FTIR spectrum (รูปที่ 5) แสดงแถบการดูดซับใน spectrum ของตัวอย่างคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด พบลักษณะของแถบการดูดซับหลัก คือ amide I ปรากฏที่ wave number เท่ากับ 1649.03 cm^{-1} มาจากการสั่น

สะเทือนจากการยืดตัวของ C=O รวมกับการหดตัวของ N-H ซึ่งเกี่ยวข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของคอลลาเจน ในส่วนของ amide II ปรากฏที่ wave number เท่ากับ 1534.29 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลคอลลาเจนยังมีพันธะไฮโดรเจนอยู่ ส่วน amide III ปรากฏที่ wave number เท่ากับ 1235.70 cm^{-1} มาจากการรวมยอดระหว่างการสั่นสะเทือนของการเปลี่ยนโครงสร้างของ N-H และการยืดตัวของ C-N เกี่ยวข้องกับโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน นอกจากนี้โครงสร้างเกลียวสามสายสามารถยืนยันได้จากแถบการดูดซับที่ wave number เท่ากับ 1450 cm^{-1} [23] โดย wave number ของแถบการดูดซับ amide I, amide II และ amide III สอดคล้องกับงานวิจัยของ Muyonga และคณะ [15] ที่พบว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลา Nile perch แสดงแถบการดูดซับหลักใน spectrum ดังนี้ amide I (1,600-1,700 cm^{-1}), amide II (1,500-1,600 cm^{-1}) และ amide III (1,200-1,300 cm^{-1}) [15]

นอกจากนี้ แถบการดูดซับ amide A และ amide B ปรากฏที่ wave number เท่ากับ 3332.80 และ 2932.56 cm^{-1} ตามลำดับ amide A เกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง N-H หากว่าตำแหน่งนี้ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจน (free N-H) จะปรากฏแถบการดูดซับในช่วง 3,400-3,440 cm^{-1} แต่ถ้าตำแหน่ง N-H เกิดพันธะไฮโดรเจนจะปรากฏแถบการดูดซับที่ wave number ต่ำลง ที่ค่าประมาณ 3,300 cm^{-1} และ amide B แสดงถึงการไม่สมมาตรของ CH_2 [15] จากการศึกษา FTIR ในครั้งนี้พบว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาดยังคงมีโมเลกุลที่จัดเรียงโครงสร้างแบบเกลียวสามสาย



รูปที่ 5 Fourier transform infrared spectrum ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด

4. สรุป

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสลาด (*Notopterus notopterus*) ด้วย 0.5 M acetic acid นาน 72 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณผลผลิตร้อยละ 38.25 ±2.30 โดยน้ำหนักแห้ง มีค่า T_{max} เท่ากับ 33.15± 0.03 °C ดูดกลืนแสงยูวีสูงสุดที่ 233 nm มีค่าการละลายสูงสุดที่ pH 1 มีค่าการละลายลดลงในช่วง pH 6-8 และความเข้มข้นของ NaCl สูงกว่าร้อยละ 2 (w/v) ที่ pH 3 และคอลลาเจนยังมีโครงสร้างเกลียวสามสายที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีน โปรลีน และไฮดรอกซีโปรลีนร้อยละ 33.7, 11.3 และ 7.5 ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงว่าหนังปลาสลาด

สามารถนำมาใช้เป็น แหล่งทางเลือกใหม่ในการสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดได้ มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน สมบัติการดูดกลืนแสงยูวี และการละลายใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาชนิดอื่น

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด (n=3)

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (ส่วนใน 1,000 ส่วน)
Asp	46±0
Thr	26±0
Ser	37±0
Glu	85±0
Gly	337±1
Ala	116±0
Val	18±0
Cys	0±0
Met	12±0
Ile	10±0
Leu	22±0
Tyr	4±0
Phe	15±0
Lys	27±0
Hylys	0±0
His	5±0
Arg	52±0
Hypro	75±1
Pro	113±0
Imino acid	188±1
Total	1,000

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่จัดสรรทุนสนับสนุนงานวิจัย ประเภททุนวิจัยทั่วไปสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2556 เพื่อสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ Professor Dr. Katsuji Morioka, Laboratory of Aquatic Product Utilization, Faculty of Agriculture, Kochi University, Kochi, Japan ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน

6. รายการอ้างอิง

[1] Brodsky, B. and Persikov, A., 2005, Advance in Protein Chemistry volume 70, Elsevier Academic Press., California.

[2] Helcke, T., 2000, Gelatin, the food technologist's friend or foe, Int. Food Ingred. 1: 6-8.

[3] 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 Chem. 89: 363-372.

[4] Zeng, S.K., Zhang, C.H., Lin, H., Yang, P., Hong, P.Z. and Jiang, Z., 2009, Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia *(Oreochromis niloticus)*, Food Chem. 116: 879-883.

[5] Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X. and Konno, K., 2009, Properties of collagen from skin, scale and bone of carp *(Cyprinus carpio)*, Food Chem. 112: 702-706.

[6] สืบสิน สนธิรัตน์, สุภาพ มงคลประสิทธิ์ และประจิตร วงศ์รัตน์, 2514, การศึกษาชนิดของปลา

สลาดและปลากรายในไทย, การประชุมวิชาการเกษตรและชีววิทยาครั้งที่ 1, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[7] สมศักดิ์ เจนศิริศักดิ์, 2516, การศึกษาชีวประวัติบางประการของปลาสลาด, รายงานประจำปี 2516, หน่วยงานพัฒนาประมงในอ่างเก็บน้ำเขื่อนอุบลรัตน์, กรมประมง, ขอนแก่น.

[8] AOAC, 1995, Official method of analysis, 16th Ed., Association of Official Chemists, Washington D.C.

[9] Hutson, P.R., Crawford, M.E. and Sorkness, R.L., 2003, Liquid chromate-graphic determination of hydroxyproline in tissue samples, J. Chromatogr. B 791: 427-430.

[10] Ahmad, M. and Benjakul, S., 2010, Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monocerous*), Food Chem. 120: 817-824.

[11] 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 Chem. 107: 1581-1586.

[12] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193: 256-275.

[13] Sompongse, W., Morioka, K. and Itoh, Y., 2003, Comparison of amino acid composition among various surimis and washed meats, Res. Rep. Kochi Univ. 52: 33-38.

[14] Binsi, P.K., Shamasundar, B.A., Dileep, A.O., Badii, F. and Howell, N.K., 2009, Rheological and functional properties of gelatin from the skin of bigeye snapper *(Priacanthus hamrur)* fish: Influence of gelatinon the gel-forming ability of fish mince, Food Hydrocol. 23: 132-145.

[15] Muyonga, J.H., Cole, C.G.B. and Duodu K.G., 2004, Extraction and physic-chemical characterisation of Nile perch *(Lates niloticus)* skin and bone gelatin, Food Hydrocol. 18: 581-592.

[16] Nagai, T. and Suzuki, N., 2000, Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins, Food Chem. 68: 277-281.

[17] ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์, 2551, คอลลาเจนจากเกล็ดปลา : การสกัดและคุณสมบัติบางประการ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[18] Giraud-Guille, M.M., Besseau, L., Chopin, C., Durand, P. and Herbage, D., 2000, Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states, Biomaterials 21: 899-906.

[19] Foegeding, E., Lanier, T.C. and Hultin, H.O., 1996, Characteristics of edible muscle tissue, pp. 879-942, In Fennema, O.R. (Ed.), Food Chemistry (3rd Ed.), Marcel Dekker, New York.

[20] Vojdani, F., 1996, Solubility, pp. 11-60, In

Hall, G.M. (Ed.), Methods of testing protein functionality, St. Edmundsbury Press, Great Britain.

[21] Boye, J.I., Ma, C.Y. and Harwalkar V.R., 1997, Thermal denaturation and coagulation of protein, pp. 25-56, In Damodaran, S. and Paraf, A. (Eds.), Food Protein and Their Applications, Marcel Dekker, New York.

[22] Nagai, T., Araki, Y. and Suzuki, N., 2002, Collagen of the skin of ocellate puffer Fish (*Takifu gurubripes*), Food Chem. 78: 173-177.

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