



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและการศึกษาสมบัติของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึก
เลี้ยงเพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

**Extraction, Characterization of Fish Skin Collagen from the Nile
Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the Farmed Giant Catfish
(*Pangasianodon gigas*) for Cosmetic Application.**

โดย

ดร.ณัฐวฑูฒิ จูติปราโมทย์
ผศ.ดร.สาโรจน์ รอดคีน

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง และ ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อส่งเสริมและปกป้องสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ให้การสนับสนุนทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ต่าง ๆ นอกจากนี้ขอขอบคุณจรัญฟาร์มในการสนับสนุนตัวอย่างในการทำวิจัย ท้ายสุดขอขอบคุณคณาจารย์สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมเกษตร และนักศึกษา

คณะผู้วิจัย





บทสรุปผู้บริหาร

เงินอุดหนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึง เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2554

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) / ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ)

(ภาษาไทย) การแยกและการศึกษาสมบัติของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึกเลี้ยงเพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

(ภาษาอังกฤษ) Extraction, Characterization of Fish Skin Collagen from the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the Farmed Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*) for Cosmetic Application.

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ/ สำนักวิชา/ สัดส่วนการทำวิจัย

หัวหน้าโครงการ ดร.ณัฐราวดี ฐิติปราโมทย์/ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง/ สัดส่วนการทำวิจัย 80%

ผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร.สาโรจน์ รอดคิน/ สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง/ สัดส่วนการทำวิจัย 20%

3. ความสำคัญของปัญหางานวิจัย

คอลลาเจนเป็นโปรตีนเส้นใยที่มีจำนวนมากในร่างกายซึ่งพบได้ทั่วไปในเอ็น กระดูก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และโดยเฉพาะที่ผิวหนัง โดยในทางอุตสาหกรรม คอลลาเจนจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงจากเศษวัตถุดิบเหลือในอุตสาหกรรม และมีการนำคอลลาเจนมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เกษษกรรม และโดยเฉพาะเครื่องสำอาง ซึ่งมีการใช้คอลลาเจนในการช่วยลบเลือนริ้วรอยและความชราของผิวหนัง ซึ่งคอลลาเจนเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น วัว และหมู แต่ด้วยข้อจำกัดบางประการของคอลลาเจนที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ปัญหาโรคควัวบ้า โรคปากเท้าเปื่อย และโรคอื่น ๆ ซึ่งอาจถ่ายทอดสู่มนุษย์ได้ รวมทั้งข้อจำกัดด้านศาสนา เช่น ศาสนาอิสลามต้องบริโภคผลิตภัณฑ์ฮาลาลเท่านั้น ทำให้มีการหาแหล่งวัตถุดิบใหม่สำหรับผลิตคอลลาเจนเพื่อทดแทน ซึ่งหนัง ครีบ และกระดูกปลาทะเล

ได้รับความสนใจและมีการวิจัยอย่างมาก แต่จากการรวบรวมข้อมูลในเบื้องต้นพบว่างานวิจัยเกี่ยวกับการสกัดและศึกษาสมบัติของคอลลาเจนจากปลาน้ำจืดในประเทศไทยยังไม่แพร่หลายมากนัก อีกทั้งในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดหลายชนิดในปริมาณมากโดยเฉพาะปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์โดยเฉพาะจังหวัดเชียงรายซึ่งเป็นแหล่งเลี้ยงปลานิลขนาดใหญ่ในเชิงพาณิชย์ของจังหวัดทางภาคเหนือ นอกจากนี้ในแถบลุ่มน้ำโขงยังมีปลาน้ำจืดที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือปลาบึก (*Pangasiandon gigas*) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด และปัจจุบันกรมประมงสามารถเพาะขยายพันธุ์ปลาบึกได้สำเร็จ ซึ่งสนองต่อเป้าหมายการอนุรักษ์เป็นอย่างดี นอกจากนี้ความสำเร็จในการขยายพันธุ์ปลาบึกทำให้เกษตรกรในเขตลุ่มแม่น้ำโขงรวมทั้งจังหวัดเชียงรายหันมาเลี้ยงปลาบึกมากขึ้น ซึ่งในอนาคตปลาบึกอาจเป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ณ เวลานั้นหากมีการแปรรูปเกิดขึ้นจะมีวัสดุเศษเหลือตามมาในปริมาณมาก ซึ่งโดยทั่วไปแล้ววัสดุเศษเหลื่อดังกล่าวมักจะมีมูลค่าต่ำมาก ๆ ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลานิลและปลาบึกโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจะสกัดและศึกษาสมบัติของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังของปลานิลและปลาบึกรวมทั้งการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เนื้อเยื่อของหนังปลาทั้งสอง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะทางเครื่องสำอาง นอกจากนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมอาหาร หรืออุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

4. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึก ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลาทั้งสอง
2. ศึกษาองค์ประกอบและสมบัติทางด้านเคมีกายภาพของคอลลาเจนที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในเวชสำอาง

5. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึกเลี้ยงในจังหวัดเชียงราย โดยสกัดและศึกษาปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาทั้งสองและเปรียบเทียบคุณสมบัติทางด้านเคมีกายภาพของคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสอง

6. ระเบียบวิธีวิจัย และผลผลิตจากการวิจัย

6.1 ระเบียบวิธีวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัยของการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยการศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อของหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยง การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสอง การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของคอลลาเจนทั้งสอง

6.2 ผลผลิตจากการวิจัย

จากการศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อและการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยง พร้อมทั้งการศึกษาองค์ประกอบและสมบัติทางด้านเคมีกายภาพของคอลลาเจนที่ได้ แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างเนื้อเยื่อหนังปลาทั้งสองแตกต่างกัน โดยหนังปลานิลมีมัดคอลลาเจนที่เล็กและเรียงตัวหลวมกว่าในหนังปลาบึก และพบว่าคอลลาเจนสามารถสกัดได้จากหนังปลานิลและหนังปลาบึกด้วยกรดอะซิติก (Acid-soluble collagen) โดยคอลลาเจนจากหนังปลานิล (28.5%) มีมากกว่าหนังปลาบึก (8.5%) แต่อย่างไรก็ตามคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลาทั้งสอง เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยแสดงแถบของโปรตีน α_1 , α_2 , β บน SDS-PAGE นอกจากนี้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนของคอลลาเจน พบว่าคอลลาเจนทั้งสองประกอบด้วยกรดอะมิโน glycine เป็นจำนวนมากที่สุดและคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลาบึกเลี้ยงประกอบด้วยกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน มากกว่าคอลลาเจนจากหนังปลานิล ดังนั้นหนังปลานิลและหนังปลาบึกเป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกที่ดีในกาสกัดคอลลาเจนเพื่อเป็นการทดแทนคอลลาเจนที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีข้อจำกัดด้านการระบาดของโรคและศาสนา อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของหนังปลาที่เป็นวัสดุเศษเหลือในอุตสาหกรรมประมง

นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ยังเพิ่มเติมการเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด คือ เอนไซม์ Bromelain, Papain, Trypsin และ เอนไซม์จากยางรัก (*Calotropis procera*) ที่เวลาที่แตกต่างกัน (0.5, 1, 2, 3 ชั่วโมง) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดสามารถย่อยคอลลาเจนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง สังเกตได้จากการหายไปของแถบของโปรตีน α_1 , α_2 , β บน SDS-PAGE และเมื่อนำคอลลาเจนไฮโดรไลเซตเหล่านี้มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า คอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากปลานิลที่เตรียมจากเอนไซม์ Bromelain ที่ 2 ชั่วโมงให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด (12.38 mgTEAC/g dw) และคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากปลาบึกเลี้ยงให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเตรียมจากทั้ง 4 เอนไซม์ที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง (5.45-7.46 mgTEAC/g dw) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสองนอกจากยังเป็นแหล่งคอลลาเจนทางเลือกที่ดีแหล่งหนึ่งแล้ว ยังสามารถเตรียมเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเซตให้ฤทธิ์ทางชีวภาพ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ได้อีกด้วย

6.3 การเผยแพร่หรือนำเสนอผลงานวิจัยในวารสารหรืองานประชุมวิชาการนานาชาติ และชาติ (ภาคผนวก)

6.3.1 การเผยแพร่ในวารสารวิชาการ

1. Thitipramote, N. and Rawdkuen, S. (2011). Histological structure and chemical composition in skin from farmed Giant catfish. *Journal of Microscopy Society of Thailand*.4(2): 89-93.

6.3.2 การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการจำนวน 4 งาน

1. Thitipramote, N. and Rawdkuen, S. (2010). Characterization of acid-soluble collagen from Nile tilapia and farmed giant catfish skins. *Proceeding of Food Innovation Asia Conference 2010: Indigenous Food Research and Development to Global Market*, BITEC, Bangkok, June 17-18, 2010. (Poster presentation)
2. Thitipramote, N., and Rawdkuen, S. (2011). Histological Structure and Chemical Composition of Skin from Farmed Giant Catfish. *Proceeding of the 28th Microscopy Society of Thailand (MST) Annual Conference*. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand, 5-7 January, 2011. (Poster presentation)
3. Siromakun, A., Tongkorsom, P., Panitworakul, P., Pommata, S., Rawdkuen, S., and Thitipramote, N. (2011). Characterization and Bioactivities of Collagen Hydrolysate from Nile Tilapia and Farmed Giant Catfish Skins. *Proceeding of the 21st International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC): Effective, Economic and Ecological Cosmetics Conference*. Centara Grand & Bangkok Convention Center, Central World, Bangkok, Thailand, 31 October- 2 November, 2011. (Poster presentation)
4. Thitipramote, N.*, Krongsuksirichai, K., Chaiwut, P. and Pintathong, P. (2012). Characterization and Bioactivities of Collagen Hydrolysates from Striped Catfish and Farmed Giant Catfish Skins. *Proceeding of the 23th Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology (TSB 2011)*, 1-2 February 2012, Bangkok, Thailand. (Poster presentation)

7. ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย ผลกระทบทางวิชาการและเทคโนโลยี

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า คอลลาเจนสามารถสกัดได้จากหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยงด้วยวิธีสกัดด้วยกรด โดยคอลลาเจนที่ได้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่มีคุณสมบัติที่ดี ดังนั้นหนังปลาทั้งสองเป็นแหล่งวัตถุดิบในการสกัดคอลลาเจนที่ดีอีกแหล่งหนึ่ง ซึ่งคอลลาเจนที่ได้สามารถใช้ทดแทนคอลลาเจนจากสัตว์เสี่ยงลูกด้วยนมที่มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ (การแพร่กระจายโรคจากสัตว์สู่มนุษย์ และข้อห้ามศาสนา) นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเซตที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ได้อีกด้วย ซึ่งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าวัสดุเศษเหลือในอุตสาหกรรมประมงอีกด้วยและลดการนำเข้าคอลลาเจนจากต่างประเทศ วิธีการสกัดสามารถสร้างหรือเพิ่มช่องทางการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงหรือแปรรูปปลาน้ำจืดได้

ชื่อเรื่อง	การแยกและการศึกษาสมบัติของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึกเลี้ยงเพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง
ผู้วิจัย	ดร.ณัฐราวุฒิ จูติปราโมทย์ ผศ.ดร.สาโรจน์ รอดคีน
ได้รับทุนสนับสนุน	เงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

บทคัดย่อ

การศึกษามุ่งสกัดคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึก พร้อมทั้งศึกษาองค์ประกอบและสมบัติทางด้านเคมีกายภาพของคอลลาเจนที่ได้ อีกทั้งเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากหนังปลาทั้งสอง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนสามารถสกัดได้จากหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยงโดยวิธีสกัดด้วยกรด ซึ่งคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลานิลและหนังปลาบึกมีปริมาณ 28.5% และ 8.5% (wet basis) ตามลำดับ ซึ่งคอลลาเจนเหล่านี้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ไม่มีพันธะ disulfide bond โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโน Glycine และ Proline และคอลลาเจนจากปลาบึกมีปริมาณกรดอะมิโน Hydroxyproline มากกว่าคอลลาเจนจากหนังปลานิล และจากการศึกษาการเสียสภาพ (Denaturation) ของคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสอง พบว่าอุณหภูมิที่คอลลาเจนเปลี่ยนแปลงความหนืดไปครั้งหนึ่ง (T_d) จากหนังปลานิล ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) สูงกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาบึกเลี้ยง ($17\text{ }^{\circ}\text{C}$) และการศึกษาการดูดกลืนแสง UV ของคอลลาเจนทั้งสองพบว่าคอลลาเจนทั้งสองไม่พบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่งแสดงว่าคอลลาเจนทั้งสองประกอบด้วยกรดอะมิโน tyrosine และ phenylalanine ปริมาณน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาองค์ประกอบอะมิโนในคอลลาเจนทั้งสอง จากการเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด คือ เอนไซม์ Bromelain, Papain, Trypsin และ เอนไซม์จากยางรัก (*Calotropic procera*) ที่เวลาที่แตกต่างกัน (0.5, 1, 2, 3 ชั่วโมง) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดสามารถย่อยคอลลาเจนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง สังเกตได้จากการหายไปของแถบของโปรตีน α_1 , α_2 , β บน SDS-PAGE และเมื่อนำคอลลาเจนไฮโดรไลเซตเหล่านี้มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า คอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากปลานิลที่เตรียมจากเอนไซม์ Bromelain ที่ 2 ชั่วโมงให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (12.38 mgTEAC/g dw) และคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากปลาบึกเลี้ยงให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเตรียมจากทั้ง 4 เอนไซม์ที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ($5.45\text{--}7.46\text{ mgTEAC/g dw}$) ดังนั้นหนังปลานิลและหนังปลาบึกซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรสามารถถูกใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกที่ดีในการสกัดคอลลาเจน และสามารถเตรียม bioactive peptide ได้จากคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากหนังปลาทั้งสองด้วยเอนไซม์

คำสำคัญ คอลลาเจน คอลลาเจนไฮโดรไลเซต ปลานิล ปลาบึกเลี้ยง หนังปลา

Title	Extraction and characterization of fish skin collagen from the Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) and the farmed Giant catfish (<i>Pangasianodon gigas</i>) for cosmetic application.
Authors	Dr. Natthawut Thitipramote Assit. Prof. Dr. Saroat Rawdkuen
Fund	Annual Fund of Mae Fah Luang University for year 2011

Abstract

This study aimed to investigate the extraction and characterization of fish skin collagen from the Nile tilapia (NT; *Oreochromis niloticus*) and the farmed Giant catfish (GC; *Pangasianodon gigas*) for cosmetic application and also to prepare the hydrolyzed collagen from these NT and GC collagens. The results showed that collagen could be extracted from NT and GC skins by using acid solubilization process. The yields of collagen from NT and GC skin were 26.5% and 5.96%, respectively (wet weight basis). Electrophoretic patterns of these collagens showed high band intensity for the major compositions, especially α - and β -components as the type I collagen without disulfide bond. Moreover, both NT and GC collagens mainly composed of Glycine and Proline, but the GC collagen had the higher hydroxyproline content than those of NT collagen. The temperature, at which the change in viscosity was half completed in the collagen solution (T_d), was about 30°C and 17°C for NT and GC, respectively. UV-visible spectra of both collagens showed the same peak at around 230 nm. Collagen hydrolysates (CH) were hydrolyzed by using 4 proteases (bromelain, papain, trypsin, and protease from *Calatropic procera* latex) (ratio of collagen to enzyme, 1:1000 g/unit) at 37°C for 0.5, 1, 2 and 3 hours. The hydrolysates obtained by using these enzymes showed the disappearance of the three major protein bands of collagen. DPPH radical-scavenging activity of NT and GC collagen hydrolysates was significantly difference among the hydrolysis conditions ($p < 0.05$). The significantly highest activity was found on bromelain-treated CH at 2 hours for NT collagen (12.38 mg TEAC g/dry weight) whereas, for GC collagen, occurred with protease from *Calatropic procera* latex-treated CH at 1 hour (7.46 mg TEAC g/ dry weight). The results suggested that the NT and GC fish skins could be used as an alternative source for collagen extraction and it is possible for obtaining bioactive peptides from these collagens hydrolyzed with the proteolytic enzymes.

Keywords: Collagen, Collagen hydrolysates, Farmed Giant catfish, Fish skin, Nile tilapia

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทสรุปผู้บริหาร	iii
บทคัดย่อ	vii
Abstract	viii
สารบัญ	ix
สารบัญตาราง	xi
สารบัญภาพ	xii
อักษรย่อและสัญลักษณ์	xiii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 ระเบียบวิจัย	7
3.1 การศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อของหนังปลานิลและปลาบึก	7
3.2 การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา	7
3.3 การศึกษาองค์ประกอบ และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของคอลลาเจน	7
3.4 การเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Collagen hydrolysate) ด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด	9
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	11
4.1 ผลศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อของหนังปลานิลและปลาบึก	11
4.2 การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึก และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของคอลลาเจน	13
4.3 การวัดปริมาณไฮดรอกซีโปรตีนในคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึก	14
4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนของคอลลาเจน	15
4.5 การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนด้วย Electrophoresis (SDS-PAGE)	17
4.6 วิเคราะห์หาความหนืด	18
4.7 การวิเคราะห์ Spectra absorption	19
4.8 การเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Collagen hydrolysate) ด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	25
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	30
ประวัตินักวิจัย	52



สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้และองค์ประกอบทางเคมีของคอลลาเจนและหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยง	13
ตารางที่ 2	ปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโปรลีนในคอลลาเจนจากหนังปลาบึกเลี้ยงและปลานิล	14
ตารางที่ 3	ปริมาณองค์ประกอบอะมิโนของคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสอง	16
ตารางที่ 4	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซต	24



สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	โครงสร้างเนื้อเยื่อหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยงด้วยกัลปังห จุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	12
รูปที่ 2	รูปแบบโปรตีน (SDS-PAGE) ของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและ หนังปลาบึกเลี้ยง ภายใต้สภาวะ reducing และ non-reducing Conditions	17
รูปที่ 3	แนวโน้มการเสียสภาพ (Denaturation curves) ของคอลลาเจน จากหนังปลานิลและปลาบึกเลี้ยง	18
รูปที่ 4	การดูดกลืนแสง (UV-visible spectra) ของคอลลาเจนจากหนัง ปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยง	19
รูปที่ 5	รูปแบบโปรตีน SDS-PAGE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจาก หนังปลานิลด้วยเอนไซม์ Bromelain (B), Papain (P), Trypsin (T) และเอนไซม์จากยางรัก (<i>Calotropic procera</i>) (C) ที่เวลา 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่สภาวะ Reducing และ Non-reducing conditions	21
รูปที่ 6	รูปแบบโปรตีน SDS-PAGE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจาก หนังปลาบึกเลี้ยง ด้วยเอนไซม์ Bromelain (B), Papain (P), Trypsin (T) และเอนไซม์จากยางรัก (<i>Calotropic procera</i>) (C) ที่เวลา 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่สภาวะ Reducing และ Non-reducing conditions.	22

อักษรย่อและสัญลักษณ์

%	เปอร์เซ็นต์
kDa	กิโลดัลตัน
UV	อัลตราไวโอเล็ต
β	เบต้า
α	แอลฟา



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ภูมิหลัง

คอลลาเจนเป็นโปรตีนเส้นใยที่มีจำนวนมากในร่างกายซึ่งพบได้ทั่วไปในเอ็น กระดูก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และโดยเฉพาะที่ผิวหนัง โดยในทางอุตสาหกรรม คอลลาเจนจัดเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่มีมูลค่าสูงจากเศษวัสดุเหลือในอุตสาหกรรม และมีการนำคอลลาเจนมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เกษษกรรม และโดยเฉพาะเครื่องสำอาง ซึ่งมีการใช้คอลลาเจนในการช่วยลบเลือนริ้วรอยและความชราของผิวหนัง เช่นการรักษาโดยฉีดคอลลาเจนเข้าใต้ผิวหนัง การรับประทานคอลลาเจน การนำคอลลาเจนไปเป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เป็นต้น ซึ่งคอลลาเจนเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่นวัว และหมู แต่ด้วยข้อจำกัดบางประการของคอลลาเจนที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ปัญหาโรควัวบ้า โรคปากเท้าเปื่อย และโรคอื่น ๆ ซึ่งอาจถ่ายทอดสู่มนุษย์ได้ รวมทั้งข้อจำกัดด้านศาสนา เช่นศาสนาอิสลามต้องบริโภคผลิตภัณฑ์ฮาลาลเท่านั้น ทำให้มีการหาแหล่งวัตถุดิบใหม่สำหรับผลิตคอลลาเจนเพื่อทดแทน ซึ่งหนัง คีบ และกระดูกปลาทะเลได้รับความสนใจและมีการวิจัยอย่างมาก โดยมีการศึกษาพบว่าคอลลาเจนจากปลา มีรูปแบบโปรตีนเช่นเดียวกับคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่จากการรวบรวมข้อมูลในเบื้องต้นพบว่างานวิจัยเกี่ยวกับการสกัดและศึกษาสมบัติของคอลลาเจนจากปลาน้ำจืดในประเทศไทยยังไม่แพร่หลายมากนัก อีกทั้งในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดหลายชนิดในปริมาณมากโดยเฉพาะปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์โดยเฉพาะจังหวัดเชียงรายซึ่งเป็นแหล่งเลี้ยงปลานิลขนาดใหญ่ในเชิงพาณิชย์ของจังหวัดทางภาคเหนือ นอกจากนี้ในแถบลุ่มน้ำโขงยังมีปลาน้ำจืดที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือปลาบึก (*Pangasion gigas*) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด แม้ว่าปลาบึกจะถูกจัดเป็นปลาชนิดที่มีจำนวนน้อยใกล้สูญพันธุ์และห้ามจับจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ แต่ปัจจุบันกรมประมงสามารถเพาะขยายพันธุ์ปลาบึกได้สำเร็จ ซึ่งสนองต่อเป้าหมายการอนุรักษ์เป็นอย่างดี นอกจากนั้นความสำเร็จในการขยายพันธุ์ปลาบึกทำให้เกษตรกรในเขตลุ่มแม่น้ำโขงรวมทั้งจังหวัดเชียงรายหันมาเลี้ยงปลาบึกมากขึ้นเนื่องจากปลาดังกล่าวเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าสูง และมีเอกลักษณ์ในรสชาติ เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ ซึ่งในอนาคตปลาบึกอาจเป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ณ เวลานั้นหากมีการแปรรูปเกิดขึ้นจะมีวัสดุเศษเหลือตามมาในปริมาณมาก ซึ่งโดยทั่วไปแล้ววัสดุเศษเหลือดังกล่าวมักจะมีมูลค่าต่ำมาก ๆ ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลานิลและปลาบึกโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจะสกัดและศึกษาสมบัติของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังของปลานิลและปลาบึกรวมทั้งการศึกษาทางวิทยาเนื้อเยื่อของหนังปลาทั้งสอง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะทางเวชสำอาง รวมทั้งการนำคอลลาเจนที่ได้ไปเป็นสารออกฤทธิ์ในการพัฒนาครีมลบเลือนริ้วรอยและให้ความชุ่มชื้นใน

การศึกษาต่อไป นอกจากนี้ก็นำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมอาหาร หรืออุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึก ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการแปรรูปปลาทั้งสอง

2. ศึกษาองค์ประกอบและสมบัติทางด้านเคมีกายภาพของคอลลาเจนที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในเวชสำอาง

1.3 ความสำคัญของงานวิจัย

1.3.1 ความสำคัญในด้านที่จะได้ความรู้เพิ่มขึ้นจากการวิจัย

หนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยงเป็นวัสดุเศษเหลือในอุตสาหกรรมประมง โดยเฉพาะในภาคเหนือ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 สามารถถูกสกัดได้จากหนังปลาทั้งสองโดยวิธีสกัดด้วยกรด และยังเป็นการเพิ่มแหล่งวัตถุดิบทางเลือกที่ดีสำหรับการสกัดคอลลาเจนเพื่อทดแทนคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ได้อีกด้วย ซึ่งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าวัสดุเศษเหลือในอุตสาหกรรมประมงอีกด้วยและลดการนำเข้าคอลลาเจนจากต่างประเทศ วิธีการสกัดสามารถสร้างหรือเพิ่มช่องทางการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงหรือแปรรูปปลาน้ำจืดได้

1.3.2 ความสำคัญในด้านที่จะนำความรู้ที่ค้นพบจากการวิจัยไปประยุกต์ใช้

สามารถนำความรู้และผลผลิตจากการวิจัยทดลองดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตเครื่องสำอางและอาหาร รวมทั้งอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยผลการศึกษาชี้ให้เห็นถึงแหล่งวัตถุดิบใหม่ในการสกัดคอลลาเจน ซึ่งสามารถลดปัญหาข้อจำกัดต่าง ๆ จากการใช้คอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ รวมทั้งวิธีสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา และคุณสมบัติของคอลลาเจนที่สกัดได้ พร้อมทั้งวิธีการเตรียมเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณสมบัติและคุณภาพตามที่ตลาดต้องการได้

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

คอลลาเจนเป็นโปรตีนเส้นใยที่มีมากในผิวหนังสัตว์ ดังนั้นหากนำหนังปลานิลและปลาบึกที่เป็นวัสดุเศษเหลือมาสกัดคอลลาเจนด้วยวิธีการสกัดด้วยกรด น่าจะได้คอลลาเจนปริมาณมากและยังเป็นแหล่งคอลลาเจนที่ดี แต่เนื่องจากโครงสร้างของปลารวมทั้งผิวหนังของปลาทั้งสองชนิด

แตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลาทั้งสองและคุณสมบัติบางประการที่แตกต่างกัน

1.5 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาสมบัติต่างๆของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึกเลี้ยงในจังหวัดเชียงราย โดยสกัดและศึกษาปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาทั้งสองและเปรียบเทียบคุณสมบัติทางด้านเคมีกายภาพของคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสอง อีกทั้งเตรียมเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากคอลลาเจนหนังปลาทั้งสองที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)



บทที่ 2

แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คอลลาเจนเป็นโปรตีนเส้นใยที่มีจำนวนมากในร่างกายโดยมีประมาณร้อยละ 30 ของโปรตีนทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ (Muyonga และคณะ 2004) ซึ่งพบได้ทั่วไปตามเอ็น กระดูก กระดูกอ่อน ฟัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และโดยเฉพาะที่ผิวหนังซึ่งมีคอลลาเจนประมาณ 50% ของคอลลาเจนทั้งหมดในร่างกาย (Li และคณะ 2005) คอลลาเจนมีมวลโมเลกุลประมาณ 285 kDa และประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 3 สายที่มีควaternary เท่ากันที่ 300 มิลลิเมตร โดยทั้งสามสายพันเป็นเกลียว (α helix) (Teglia และ Secchi 1999) คอลลาเจนได้มีการศึกษาและจัดจำแนกได้อย่างน้อย 26 ชนิด โดยคอลลาเจนที่พบมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน รวมทั้งกระดูกและผิวหนังคือ คอลลาเจนชนิดที่ 1 (Muyonga และคณะ 2004; Sato และคณะ 2002) ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำไปประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมและเครื่องสำอางอย่างกว้างขวางเนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีความระคายเคืองต่อร่างกายต่ำ (low immunogenicity) (Swatschek และคณะ 2002, Zhuang และคณะ 2009) โดยถูกใช้เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญที่ทำให้ผิวกระชับ (firmness) มีความยืดหยุ่น (viscoelastic และ flexibility) และเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว (hydration) รวมทั้งต่อต้านริ้วรอย (anti-wrinkle) และความชราของผิว (skin aging) การเกิดริ้วรอยและความชราของผิวส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการลดลงของปริมาณคอลลาเจนในผิว ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการลดลงของคอลลาเจนมีหลายปัจจัยทั้งภายนอกเช่น แสง UVA และ UVB ในแสงแดด และปัจจัยภายในเช่น ภาวะชรา และการขาดฮอร์โมนเพศ โดยเฉพาะวัยหมดประจำเดือน (Verdier-Sevrain และคณะ 2005; Pugliese 2006; Zhuang และคณะ 2009) ดังนั้นปัจจุบันเทคโนโลยีความงามในการลบเลือนริ้วรอยและความชราของผิวหนังจึงมีการใช้คอลลาเจนซึ่งเป็นทางเลือกที่นิยมอย่างแพร่หลายทางหนึ่ง โดยมีการรักษาโดยการฉีดคอลลาเจนเข้าใต้ผิวหนัง การรับประทานคอลลาเจน การนำคอลลาเจนไปเป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เป็นต้น (Teglia และ Secchi 1999; Pugliese 2006; Zhuang และคณะ 2009)

คอลลาเจนจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้ที่มีมูลค่าสูงจากเศษวัตถุดิบเหลือทิ้งในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูป มีการนำคอลลาเจนดังกล่าวใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เภสัชกรรม และเครื่องสำอาง ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดคอลลาเจนรวมทั้งศึกษาคุณสมบัติคอลลาเจนจากสัตว์หลากหลายชนิด คอลลาเจนในท้องตลาดส่วนใหญ่ถูกสกัดจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยเฉพาะจากวัวและหมู แต่เนื่องจากปัญหาเรื่องโรคระบาดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น โรควัวบ้า โรคปากเท้าเปื่อย ซึ่งอาจถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ได้ รวมทั้งข้อจำกัดด้านศาสนา เช่นศาสนาอิสลามต้องบริโภคผลิตภัณฑ์ฮาลาลเท่านั้น ส่งผลให้มีการสรรหาวัตถุดิบแหล่งใหม่สำหรับการผลิตคอลลาเจนเพื่อทดแทนแหล่งวัตถุดิบดังกล่าว การผลิตคอลลาเจนจากวัตถุดิบเหลือจากอุตสาหกรรมประมง ได้แก่ หนัปลา ครีบบปลา และกระดูกปลา จัดเป็นแนวทางหนึ่งที่มีความสนใจและมีการวิจัยอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจากวัตถุดิบเหลือจากการแปรรูปปลาในอุตสาหกรรมมีปริมาณกว่าร้อยละ 30 โดยเป็นส่วนกระดูก (20-25%) และหนัง

(5-7%) (Gomez-Guillen และคณะ 2002) ปัจจุบันมีการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับคอลลาเจนจากหนังปลาหลากหลายชนิด ซึ่งรวมทั้งการศึกษาวิธีการสกัด คุณลักษณะ และการประยุกต์ใช้คอลลาเจนจากปลา (Muyonga และคณะ 2004; Jongjareonrak และคณะ 2005; Kittipahattanabawon และคณะ 2005; Woo และคณะ 2008) โดยคอลลาเจนจากปลามีรูปแบบของโปรตีนเช่นเดียวกับคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่ามีคุณสมบัติเหมือนกัน แม้ว่าคอลลาเจนปลาทะเลจะมีปริมาณกรดอะมิโน hydroxyprolin น้อยกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งอาจทำให้คอลลาเจนจากปลามีความสามารถทนความร้อนได้น้อยกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Easton, 1955) นอกจากนี้ปริมาณคอลลาเจนจากหนังปลาทะเลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น คอลลาเจนจากหนังปลา bigeye snapper และปลา Brownstripe red snapper สูงถึงร้อยละ 10.94 และ 9 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ (Jongjareonrak และคณะ 2005; Kittipahattanabawon และคณะ 2005) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนใหญ่จะให้ความสำคัญกับวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาทะเลในการใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดคอลลาเจนเป็นหลัก เช่น Bigeye snapper, Baltic cod, Brownstripe red snapper, Tuna, Squid, Shark เป็นต้น (Kittipahattanabawon และคณะ 2005; Jongjareonrak และคณะ 2005, 2006a, b; Nagai และ Suzuki 2000; Cho และคณะ 2004) สำหรับในประเทศไทยงานวิจัยที่ศึกษาการสกัดและคุณสมบัติของคอลลาเจนจากปลาน้ำจืดยังมีไม่แพร่หลายมากนัก แม้ว่าจากสถิติกรมประมงปี 2550 จะแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดปริมาณมากถึง 489,100 ตัน คิดเป็นมูลค่า 21,122 ล้านบาท ซึ่งปลาน้ำจืดที่มีการเพาะเลี้ยงมากที่สุดคือ ปลานิล (*Nile tilapia* ชื่อวิทยาศาสตร์ *Oreochromis niloticus*) มีปริมาณมากถึง 213,800 ตัน และมีมูลค่าถึง 7,779.9 ล้านบาทในปี 2550 และในภาคเหนือของประเทศไทย จังหวัดเชียงรายเป็นแหล่งเลี้ยงปลาน้ำจืดขนาดใหญ่ทำให้มีผลผลิตปลาค่อนข้างมากโดยเฉพาะปลานิล (สถิติการประมง กรมประมง, 2010a) นอกจากปลานิลแล้วในแถบลุ่มแม่น้ำโขงรวมทั้งจังหวัดเชียงรายยังมีปลาน้ำจืดที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง คือปลาบึก (*Giant catfish* ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pangasianodon gigas*) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ขนาดโตเต็มวัยยาวประมาณ 3 เมตร มีน้ำหนักมากกว่า 250 กิโลกรัม แม้ว่าปลาบึกจะถูกจัดเป็นปลาชนิดที่มีจำนวนน้อยใกล้สูญพันธุ์ แต่กรมประมงได้พยายามดำเนินการเพาะขยายพันธุ์จนประสบความสำเร็จครั้งแรกในปี 2526 โดยปัจจุบันสามารถเพาะขยายพันธุ์ปลาบึกได้สำเร็จ และกระจายแจกจ่ายลูกปลาบึกไปตามศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดทั้ง 4 ภาคทั่วประเทศโดยในภาคเหนือที่จังหวัดเชียงรายและพะเยา เพื่อปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติและจำหน่ายพันธุ์ปลาบึกให้เกษตรกรนำไปเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ (กรมประมง, 2010b) ปัจจุบันมีเกษตรกรที่สนใจเลี้ยงปลาบึกจำนวนมากและมีแนวโน้มมากยิ่งขึ้นเนื่องจากเอกลักษณ์ในรสชาติ คุณค่าทางอาหารสูง ซึ่งอาจทำให้แนวโน้มตลาดอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์จากปลาบึกมีมากขึ้น ดังนั้นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์จากปลานิลและปลาบึกมีจำนวนมาก ซึ่งจัดเป็นแหล่งวัตถุดิบใหม่ที่สำคัญและมีปริมาณมากแหล่งหนึ่งสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดคอลลาเจน นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าและใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือได้อีกด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาพบว่ามียาหลายวิธี แต่การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยวิธี acid-solubilised collagen (9% คอลลาเจน) ให้ผลผลิตที่สูงกว่าการสกัดด้วยวิธี

pepsin-solubilised collagen (4.7% คอลลาเจน) เช่นปลา Brownstripe red snapper (Jongjareonrak และคณะ 2005) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาคอลลาเจนจากหนังปลานิล และปลาบึกซึ่งมีการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์มากในจังหวัดเชียงรายด้วยวิธีการสกัดแบบ acid-solubilised และศึกษาคุณสมบัติของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาทั้งสอง



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อของหนังปลานิลและปลาบึก

นำหนังปลานิลและหนังปลาบึกสดมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำมารักษาสภาพด้วยสารละลาย Neutral buffer formalin ร้อยละ 10 ทำการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาทาง paraffin section ตามวิธีของ Bancroft และ Gamble (2002) โดยนำเอาหนังปลาที่รักษาสภาพแล้วมา dehydration ด้วยสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จากนั้นทำให้ใสด้วย Xylene แล้วฝังเนื้อเยื่อลงใน paraffin wax ทำการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโทม (rotary microtome) ที่ความหนา 6 ไมโครเมตร ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม hematoxylin และ eosin (ภาคผนวก ก) นำสไลด์มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พร้อมถ่ายภาพเพื่อศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อหนังปลาทั้งสอง

3.2 การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา

การสกัดคอลลาเจนทำตามวิธีของ Kittiphattanabawon และคณะ (2005) โดยนำตัวอย่างหนังปลานิลและปลาบึกมากำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นกำจัดไขมันออกด้วยสารละลายบิวทานอล ล้างหนังปลาที่ได้มาด้วยน้ำเย็น สกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นทำแห้งโดยวิธีแช่แข็ง ใช้ตัวอย่างคอลลาเจนที่ได้สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3 การศึกษาองค์ประกอบ และ คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของคอลลาเจน

3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน ในตัวอย่างเจลาตินตามวิธีของ A.O.A.C. (2005) โดยหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างด้วยวิธีของ Kjeldahl สำหรับปริมาณความชื้นในตัวอย่างหาโดยใช้วิธีการอบตัวอย่างในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 ± 2 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักของตัวอย่างคงที่ หาปริมาณเถ้าโดยการเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ปริมาณไขมันในตัวอย่างหาโดยใช้วิธี Soxhlet Extraction System

3.3.2 การวัดปริมาณ hydroxyproline

การวัดปริมาณ hydroxyproline ในคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสอง ดัดแปลงจากวิธีของ Bergman และ Loxley (1963) นำคอลลาเจนมาละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำสารละลายคอลลาเจน 0.1 มิลลิลิตร มาใส่ไอโซโพรพานอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่มีสารผสมของ chloramine T ร้อยละ 7 น้ำหนัก/ปริมาตร และ acetate ต่อ citrate buffer ในอัตราส่วน 1:4 ปริมาตร/ปริมาตร หลังจากนั้นใส่ Ehrlich's reagent solution 1.3 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นทำให้เย็น และเติมสารละลายไอโซโพรพานอล 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 558 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer นอกจากนี้ใช้ commercial คอลลาเจนจากวัวมาเปรียบเทียบมาตรฐาน

3.3.3. วิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโน

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในตัวอย่างคอลลาเจนโดยวิธีการย่อยสลายด้วยกรดมีเทนซัลโฟนิก เข้มข้น 4 โมลาร์ ที่ประกอบไปด้วยอะมิโนเอธิลอินโดลเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นการทำเจือจางสารละลายที่ได้ด้วยซิทเรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 2.2 ก่อนที่จะนำไปทดสอบด้วยเครื่อง Amino acid analyzer ณ. บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง(ประเทศไทย)จำกัด เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณขององค์ประกอบอะมิโนในตัวอย่างคอลลาเจน

3.3.4 การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนด้วย Electrophoresis

วิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนของคอลลาเจนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยนำตัวอย่างคอลลาเจนที่ผ่านการละลายด้วยสารละลายเอสดีเอสเข้มข้นร้อยละ 1 และสารละลายยูเรียเข้มข้น 3.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างที่ได้ไปผสมกับบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งประกอบไปด้วย ทริสไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์พีเอช 6.8 เอสดีเอส ร้อยละ 4 กลีเซอรอลร้อยละ 20 และ Beta-mercaptoethanol ร้อยละ 10 และโหลดโปรตีนตัวอย่าง 20 ไมโครกรัมลงใน SDS-PAGE เจลที่เตรียมจากความเข้มข้นของ stacking gel ร้อยละ 5 และ running gel ร้อยละ 7.5 หลังจากการแยกโปรตีนแล้วทำการย้อมติดสีและล้างสีย้อมออกก่อนทำแห้ง

3.3.5. วิเคราะห์หาความหนืด

ตรวจสอบความหนืดของสารละลายคอลลาเจน ที่ช่วงอุณหภูมิ 4-50 องศาเซลเซียสด้วยเครื่อง Brookfield viscometer ตามวิธีการของ Cho และคณะ (2006) โดยละลายคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.03 น้ำหนัก/ปริมาตรในสารละลายกรดอะซิติก 0.1 โมลาร์ แล้วให้ความร้อนแก่สารละลายจากอุณหภูมิ 4 ถึง 50 องศาเซลเซียส ติดตามความหนืดของตัวอย่างซึ่ง

สัมพันธ์กับอุณหภูมิด้วยโปรแกรมในเครื่อง Brookfield Viscometer ซึ่งติดตั้งด้วยเข็มเบอร์ 1 (Model RVT) ด้วยความเร็ว 100 rpm

3.3.6 การวิเคราะห์ Spectra absorption

นำคอลลาเจนมาละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ให้ได้ความเข้มข้นคอลลาเจน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 220-600 นาโนเมตร ที่อัตราเร็ว 50 นาโนเมตรต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.4 การเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Collagen hydrolysate) ด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด

วิธีการเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Yang และคณะ (2008) และ Thitipramote และคณะ (2010) โดยเอนไซม์โปรตีนเอสที่ใช้มี 4 ชนิด คือ เอนไซม์ Bromelain (จากสับปะรด, enzyme activity (EA)=44.68 ยูนิต/มิลลิกรัม solid) เอนไซม์ Papain (จากยางมะละกอ, EA= 143.1 ยูนิต/มิลลิกรัม solid) เอนไซม์ Trypsin (จากตับอ่อนของวัว, EA=63.7 ยูนิต/มิลลิกรัม solid) และเอนไซม์จากยางดอกกรัก Calotropic procera (EA=326 ยูนิต/มิลลิกรัม solid) ทำการละลายคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึกที่สกัดได้จากวิธี acid solubilization process ปริมาณ 0.25 กรัม ใน 0.1 โมลาร์ Sodium phosphate buffer พีเอช 7.0 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นใส่เอนไซม์แต่ละชนิดด้วยอัตราส่วนคอลลาเจนต่อเอนไซม์ 1 ต่อ 1000 (น้ำหนักต่อยูนิต) ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ด้วยการเขย่า 100 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดปฏิกิริยา หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยการนำสารละลายไปแช่ในเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บ Supernatants ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้การศึกษาต่อไป

3.4.1 การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตด้วย Electrophoresis

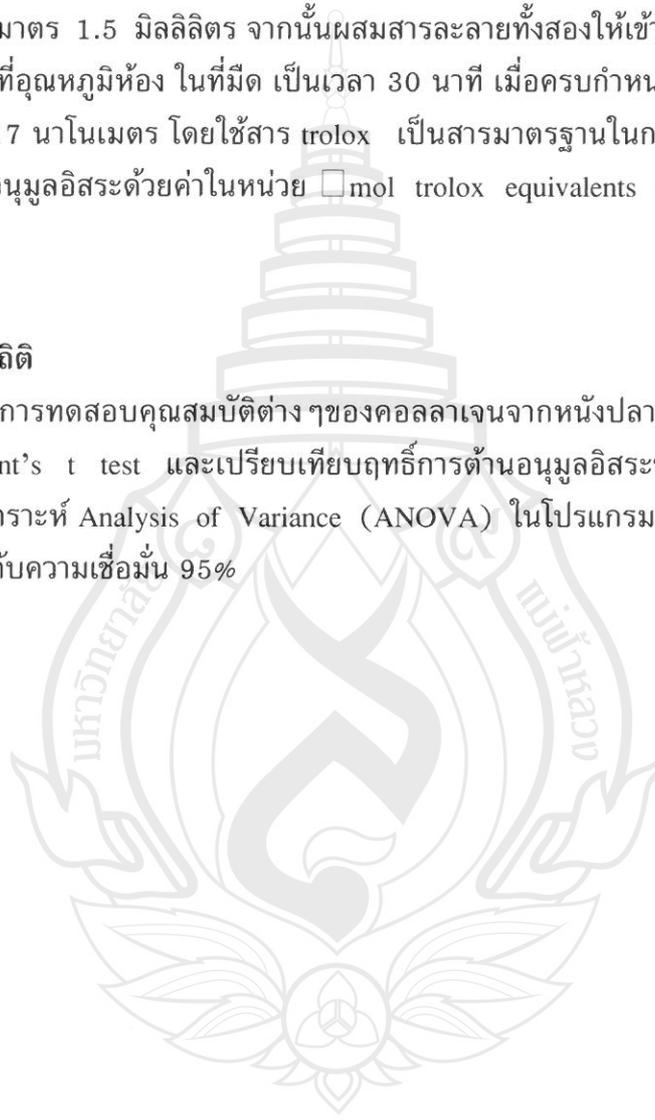
วิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนของคอลลาเจนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE โดยนำตัวอย่างคอลลาเจนไฮโดรไลเซตที่ได้มาเติมสารละลาย sample buffer ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 (v/v) ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีสารรีดิวส์ ตัวอย่างถูกโหลดลงใน SDS-PAGE เจลที่เตรียมจากความเข้มข้นของ stacking gel ร้อยละ 5 และ running gel ร้อยละ 7.5 หลังจากการแยกโปรตีนแล้วทำการย้อมติดสีและล้างสีย้อมออกก่อนทำแห้ง

3.4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตด้วยวิธีการ DPPH radical scavenging activity

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ซึ่งดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Khantaphant และ Benjakul (2008) นำสารละลายคอลลาเจนไฮโดรไลเซตปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ที่ละลายใน 95% เอทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากันด้วย vortex mixer และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้สาร trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ และแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยค่าในหน่วย $\mu\text{mol trolox equivalents (TEAC)}/\text{mg protein}$

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบผลการทดสอบคุณสมบัติต่างๆของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึก ด้วยการวิเคราะห์ Student's t test และเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตด้วยการวิเคราะห์ Analysis of Variance (ANOVA) ในโปรแกรม SPSS Version 11.5 for Window ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



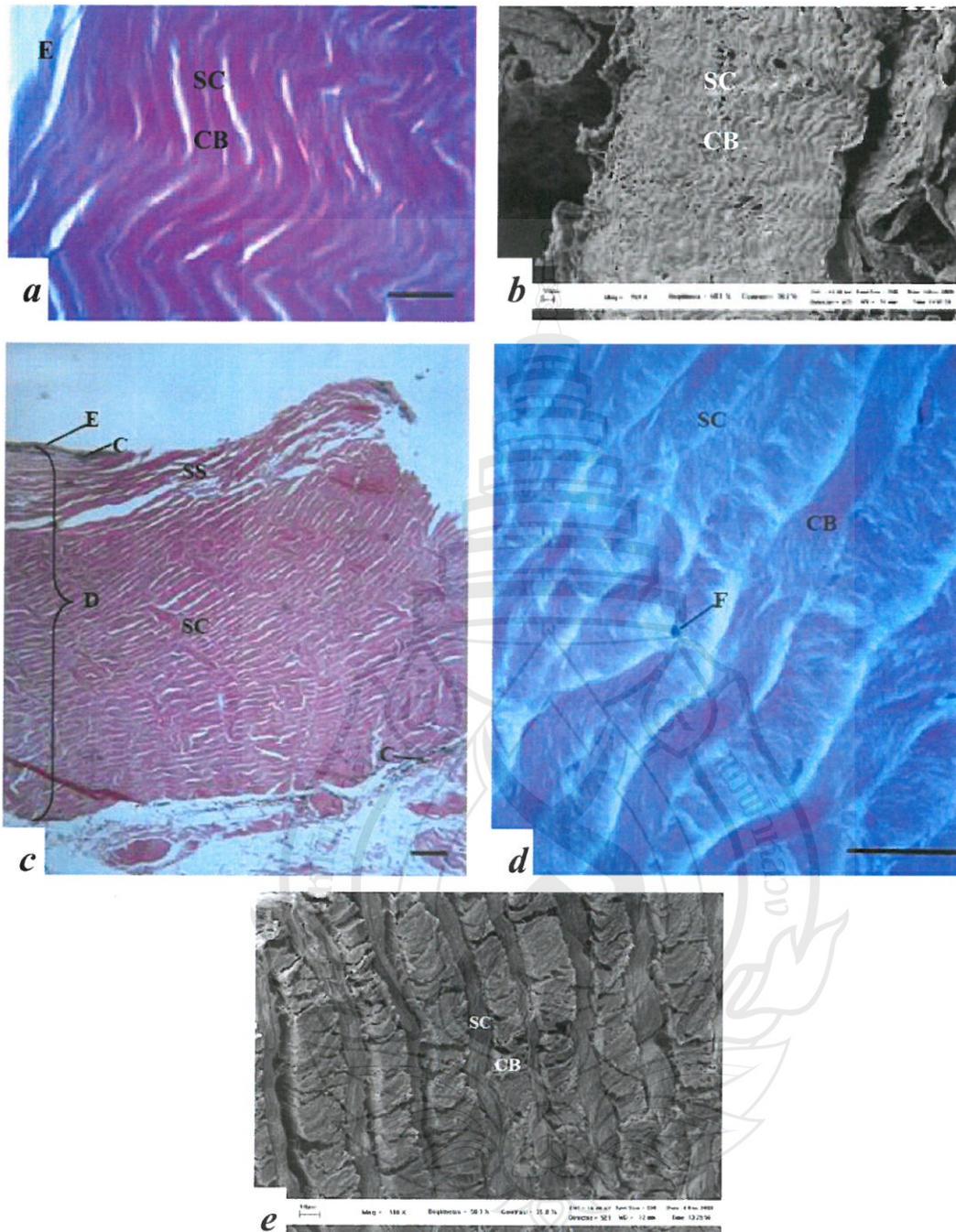
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อของหนังปลานิลและปลาบึก

ผลการศึกษาโครงสร้างทางเนื้อเยื่อวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Light microscope: LM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope: SEM) ของหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยงแสดงดังรูปที่ 1 โดยหนังปลานิลและหนังปลาบึกประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2 ชั้นคือ ชั้น epidermis และชั้น dermis ซึ่งชั้น epidermis เป็นชั้นนอกสุดและเป็นชั้นที่บาง โดยในหนังปลาบึกหนาประมาณ 20 ไมโครเมตร ส่วนในปลานิล epidermis บางมากและไม่ชัดเจน (รูปที่ 1a,c) ความหนาของชั้น epidermis จะแตกต่างกันในสายพันธุ์ของปลา รวมทั้งอายุและสิ่งแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ (Elliott, 2000) นอกจากนี้ชั้น dermis เป็นชั้นล่างลงมาและเป็นชั้นที่หนา โดยในปลาตระกูลปลาหนัง (0.6–20 ไมโครเมตร) เช่นปลาสวาย รวมทั้งปลาบึก (~ 0.94 ไมโครเมตร) (รูปที่ 1c) จะมีความหนาของ dermis มากกว่าปลาที่มีเกล็ด (<0.2 ไมโครเมตร) เช่น ปลานิล (รูปที่ 1a) ปลา Zebrafish (Guellec *et al.*, 2004). ภายในหนังชั้น dermis ของปลาบึกสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชั้นย่อยได้ชัดเจน แต่ไม่พบชั้นดังกล่าวในหนังปลานิล โดยชั้นย่อย dermis ของปลาบึก คือ ชั้น stratum spongiosum (ชั้นบนติดกับชั้น epidermis และชั้นที่บางกว่า ~200 ไมโครเมตร) และชั้น stratum compactum (ชั้นที่หนากว่า ~ 740 ไมโครเมตร) นอกจากนี้ยังมี chromatophores ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ด้านบนของชั้น dermis ของหนังปลาบึก (รูปที่ 1c) ความสัมพันธ์ของความหนาของชั้นย่อย dermis ทั้งสองชั้น ขึ้นอยู่กับการมีและไม่มีเกล็ดของปลา และชนิดของปลา (Hawkes, 1974; Elliott, 2000) และยังพบเซลล์ fibroblast ที่ชั้น stratum compactum ของปลาทั้งสองชนิดอีกด้วย (รูปที่ 1d) โดยเซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตคอลลาเจน ลักษณะดังกล่าวพบได้ในปลาทั่วไป เช่นปลา sole fish (Hawkes, 1974).

การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาค (Ultrastructure) ของหนังปลาทั้งสอง (รูปที่ 1b,e) แสดงให้เห็นว่า ชั้น stratum compactum ของหนังปลาทั้งสอง มี Collagen bundles อยู่แต่โครงสร้างดังกล่าวแตกต่างกัน โดยหนังปลานิลมี collagen bundle ที่เล็กกว่า และเรียงตัวหลวมกว่า ในขณะที่หนังปลาบึกมี collagen bundle ที่ใหญ่กว่า และเรียงตัวกันแน่นโดยเรียงตัวในแนว 3 แนว (horizontal, longitudinal and vertical planes) (รูปที่ 1e) ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ในปลาหนังตระกูล catfish อื่นๆ ได้ (Guellec และคณะ, 2004) โดยการเรียงตัวของ collagen bundle สัมพันธ์กับความแข็งแรงและทนทานของหนังปลา และยังเป็นองค์ประกอบหลักทางเคมีและโครงสร้างของหนังปลา (Elliott, 2000) ดังนั้นโครงสร้างของหนังปลาทั้งสองที่แตกต่างกัน อาจเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณคอลลาเจนที่ได้จากการสกัดแตกต่างกัน



รูปที่ 1 โครงสร้างเนื้อเยื่อหนังปลานิล (a-b) และหนังปลาบึกเลี้ยง (c-e) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (LM: a, c-d) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM: b,e); CB=Collagen bundle; D=Dermis; F=Fibroblast; SC= Stratum compactum; SS=Stratum spongiosum. Scale bars= 10 ไมโครเมตร (b,e) 30 ไมโครเมตร (a), 50 ไมโครเมตร (d) และ 100 ไมโครเมตร (c)

4.2 การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึก และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของคอลลาเจน (Proximate compositions and collagen recovery)

ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้และองค์ประกอบทางเคมีของคอลลาเจนและหนังปลาทั้งสองชนิดแสดงในตารางที่ 1 โดยคอลลาเจน (Acid-soluble collagen: ASC) ที่สกัดได้จากหนังปลานิล (28.5% wet basis) มีปริมาณที่มากกว่าหนังปลาบึก (8.48 %) และคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลานิลยังสูงกว่าการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาอื่นๆ เช่น ปลา bigeye snapper (10.94%), ปลา brownbanded bamboo shark (9.38%) (Kittiphattanabawan และคณะ, 2005; 2010) และ ปลา brownstripe red snapper (9%) (Jongjareonrek และคณะ, 2005) รวมทั้งปลาตระกูล catfish เช่นปลาสาวย (10.2%) (Wongwien และคณะ, 2010) และปลา longbarbel catfish (16.8%) (Zang และคณะ, 2009) โดยความแตกต่างของปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาต่างชนิดกันอาจเป็นเพราะความแตกต่างของโครงสร้างของหนังปลาแต่ละชนิดและอายุของปลาที่นำมาศึกษา นอกจากนี้โครงสร้างของคอลลาเจนมีปลายทั้งสองด้าน (non-helical part) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิด cross-linking ที่ telopeptide region โดยการเกิด cross-linking ระหว่างคอลลาเจนจำนวนมากจะทำให้คอลลาเจนทนต่อการสกัดด้วยกรดมากขึ้น ทำให้สกัดได้น้อยลง (Duan และคณะ, 2009; Kittiphattanabawan และคณะ, 2010) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหนังปลาบึกมีโครงสร้างที่แข็งแรงโดยมี cross-linking ระหว่างคอลลาเจนที่แข็งแรงกว่าหนังปลานิลและปลาอื่นๆ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของคอลลาเจนและหนังปลานิลและหนังปลาบึก (n=3) แสดงให้เห็นว่า คอลลาเจนมีองค์ประกอบหลักเป็นโปรตีน (86-94%) และมีความชื้น (3.3-4.8%) ไขมัน (0.1-3.4%) และเถ้า (0.1-0.2%) โดยคอลลาเจนจากหนังปลานิลมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (94.55%) เมื่อเทียบกับคอลลาเจนจากหนังปลาบึก (86.28%) แต่ทางกลับกัน หนังปลานิล (26.55%) มีโปรตีนน้อยกว่าหนังปลาบึก (34.03%) โดยผลการศึกษาสอดคล้องกันการศึกษาก่อนหน้าในปลา bigeye snapper (Kittiphattanabawan และคณะ, 2005)

ตารางที่ 1 ปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้และองค์ประกอบทางเคมีของคอลลาเจนและหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยง

Parameters (%)	Collagen		Fish skin	
	Nile tilapia	Giant catfish	Nile tilapia	Giant catfish
Yield	28.50±2.35 ^a	8.48±0.18 ^b	-	-
Protein	94.55±0.27 ^a	86.28±0.40 ^b	26.55±1.26 ^a	34.03±0.54 ^b
Moisture	3.30±0.65	4.83±2.68	69.68±0.40 ^a	64.86±0.40 ^b
Lipid	3.42±0.65 ^a	0.12±0.04 ^b	4.40±0.86	2.69±1.65
Ash	0.16±0.02	0.08±0.01	0.20±0.00	0.25±0.01

Values (Mean±S.E.; n=3) with a row followed by a different superscript in either collagen or fish skin differ statistically (independent t test; $p < 0.05$)

4.3 การวัดปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึก

ผลการศึกษาปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึกเลี้ยง รวมทั้งคอลลาเจนจากเอ็นวัวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในคอลลาเจนแต่ละชนิด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยคอลลาเจนจากหนังปลาบึกมีปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนมากที่สุด (8.46 มิลลิกรัมต่อกรัมคอลลาเจน) ซึ่งมากกว่าคอลลาเจนเอ็นวัวและคอลลาเจนหนังปลานิล (3.78 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อกรัมคอลลาเจน ตามลำดับ) (ตารางที่ 2) จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าไฮดรอกซีโปรลีนบทบาทเกี่ยวข้องกับความทนต่อความร้อนของคอลลาเจน (Thermal stability) โดยเฉพาะไฮดรอกซีโปรลีนที่ตำแหน่ง Y ของลำดับ Gly-X-Y ของโพลีเมอร์คอลลาเจนของสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีส่วนช่วยให้ 3 สายของ helix collagen คงตัวอยู่ได้ และทนต่อความร้อนได้มากขึ้น (Improta และคณะ 2001; Shoulder และ Raines, 2009). ดังนั้นปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนของคอลลาเจนหนังปลาบึกที่มีมากกว่าหนังปลานิล อาจเป็นเพราะปลาบึกเป็นปลาหนังไม่มีเกล็ดไว้สำหรับป้องกันตัวและทนต่อสภาวะแวดล้อม ดังนั้นหนังปลาบึกจึงมีการปรับตัวโดยมีโครงสร้างที่หนาและมีมัดคอลลาเจนที่แข็งแรง (ตั้งผลการศึกษา โครงสร้างหนังปลา) และมีปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนมากกว่าปลานิลเพื่อทนต่อการเปลี่ยนแปลงจากภายนอก แต่อย่างไรก็ตามปริมาณคอลลาเจนของปลาน้ำจืดรวมทั้งปลานิลและปลาบึกมีปริมาณน้อยกว่าคอลลาเจนจากปลาทะเล เช่น ปลา deep-sea red fish (67.3 มิลลิกรัมต่อกรัมคอลลาเจน) (Wang และคณะ 2007) และปลา rainbow trout (67.2 มิลลิกรัมต่อกรัมคอลลาเจน) (Tabarestani, 2012) ซึ่งอาจเป็นเพราะปลาทะเลอยู่ในสภาวะที่มีความแปรปรวนของอุณหภูมิมากกว่า และน้ำทะเลมีแรงดันและความเค็มมากกว่าปลาน้ำจืด ดังนั้นปลาทะเลจึงคอลลาเจนที่คงตัวมากกว่าโดยมีปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนมากกว่าปลาน้ำจืด

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโปรลีนในคอลลาเจนจากหนังปลาบึกเลี้ยงและปลานิล

ตัวอย่างคอลลาเจน	ปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโปรลีน (มิลลิกรัมต่อกรัมคอลลาเจน)
คอลลาเจนจากหนังปลานิล	1.25 ± 0.07 ^c
คอลลาเจนจากหนังปลาบึกเลี้ยง	8.46 ± 0.03 ^a
คอลลาเจนจากเอ็นวัว	3.78 ± 0.19 ^b

ตัวอักษรยกบนค่าภายในแถวเดียวกัน (Mean ± S.D.; n=3) แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ANOVA)

4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนของคอลลาเจน

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาบึกเลี้ยงและปลานิลด้วยวิธี AOAC (2000), 994.12, 988.15 ด้วยเครื่อง GC/MS แสดงดังตารางที่ 3 โดยคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสองประกอบด้วยกรดอะมิโน proline, hydroxyproline และ hydroxylysine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบเฉพาะคอลลาเจนเท่านั้น (Jongjareonrak และคณะ 2005) และกรดอะมิโนที่มีปริมาณมากที่สุดในคอลลาเจนปลานิลและปลาบึกคือ กรดอะมิโน Glycine (8,854 และ 7,581 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมคอลลาเจน ตามลำดับ) และกรดอะมิโน Proline (6,749 และ 5,479 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมคอลลาเจน ตามลำดับ) ซึ่งโดยปกติคอลลาเจนประกอบด้วยกรดอะมิโน Glycine เป็นส่วนใหญ่มากถึงประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวของคอลลาเจนจากแต่ละ species แตกต่างกัน (Jongjareonrak และคณะ 2005; Duan และคณะ 2009) นอกจากนี้กรดอะมิโนที่มีน้อยที่สุดในคอลลาเจนหนังปลานิลและปลาบึกเลี้ยงทั้งสองคือ กรดอะมิโน Arginine (~0% ในหนังปลาทั้งสอง) กรดอะมิโน Tryptophan (0.1% ในหนังปลาทั้งสอง) กรดอะมิโน Cystine (0.4% และ 0.2% ตามลำดับ) กรดอะมิโน Phenylalanin (1.1% และ 1.0% ตามลำดับ) และกรดอะมิโน Tyrosine (3.4% ในหนังปลาทั้งสอง) (ตารางที่ 3) ซึ่งโดยทั่วไปคอลลาเจนชนิด I จะมีปริมาณกรดอะมิโน cysteine (~0.2%) และแทบจะไม่พบกรดอะมิโน Tryptophan (Singh และคณะ 2011)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนของปลาทั้งสองชนิดพบว่า คอลลาเจนจากหนังปลานิลส่วนมากมีกรดอะมิโนมากกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาบึก และปริมาณกรดอะมิโนในกลุ่ม imino (กรดอะมิโน Proline และ Hydroxyproline) ของคอลลาเจนหนังปลานิล (20.1%) มากกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาบึก (19.9%) แม้ว่าปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนของคอลลาเจนหนังปลาบึกเลี้ยง (6.4%) มีปริมาณมากกว่าคอลลาเจนจากหนังปลานิล (4.8%) (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนดังกล่าวในการศึกษาก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 2) นอกจากนี้โดยทั่วไปปริมาณกรดอะมิโน imino จากคอลลาเจนจากหนังปลารวมทั้งปลาทั้งสองชนิดจะมีจำนวนน้อยกว่าคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Jongjareonrak และคณะ 2005) แต่ปริมาณของกรดอะมิโนกลุ่ม imino ของหนังปลานิลและปลาบึกมีใกล้เคียงกับคอลลาเจนจากหนังปลาอื่นๆ เช่นปลาสวาย (striped catfish: 20.6%) (Singh และคณะ 2011) ปลา Calf (21.5%) และมีปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวมากกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาบางชนิด เช่น ปลา Cod (15.4%) ปลา Carp (19.0%) (Duan และคณะ 2009) ความแตกต่างกันในปริมาณของกรดอะมิโนกลุ่ม imino ที่แตกต่างกันในแต่ละ species เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมและที่อยู่อาศัยของปลาแต่ละชนิด โดยเฉพาะอุณหภูมิ (Muyonga และคณะ 2004; Jongjareonrak และคณะ 2005; Singh และคณะ 2011) กรดอะมิโนกลุ่ม imino เกี่ยวข้องกับการเสถียรภาพของคอลลาเจนจากความร้อน (denaturation temperature) ซึ่งเกี่ยวข้องกับความคงตัวของโครงสร้างเกลียวของสายคอลลาเจน (helix collagen) (Jongjareonrak และคณะ 2005).

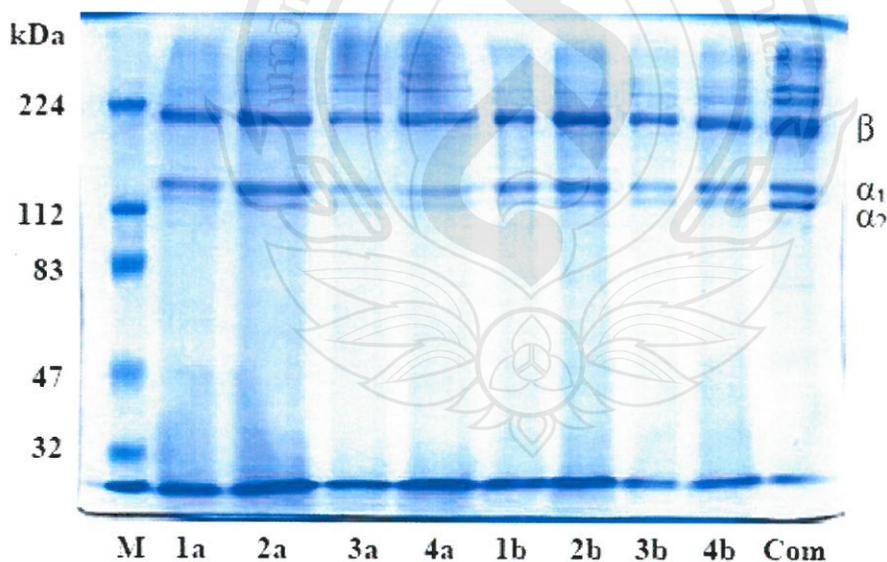
ตารางที่ 3 ปริมาณองค์ประกอบอะมิโนของคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสอง

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโนของคอลลาเจน หนังปลานิล		ปริมาณกรดอะมิโนของคอลลาเจน หนังปลาบึกเลี้ยง	
	มิลลิกรัม/ 100 กรัมคอลลาเจน	เปอร์เซ็นต์	มิลลิกรัม/ 100 กรัมคอลลาเจน	เปอร์เซ็นต์
	Alanine	4,779	10.8	4,228
Arginine	<5	0.0	5	0.0
Aspartic acid	1,729	3.9	1,641	4.1
Cystine	181.2	0.4	85.9	0.2
Glutamic acid	4,840	11.0	5,005	12.4
Glycine	8,854	20.1	7,581	18.7
Histidine	1,874	4.2	1,774	4.4
Hydroxylysine	1,707	3.9	824.6	2.0
Hydroxyproline	2,121	4.8	2,583	6.4
Isoleucine	1,139	2.6	1,475	3.6
Leucine	3,654	8.3	3,436	8.5
Lysine	964	2.2	954	2.4
Methionine	984.8	2.2	1,060	2.6
Phenylalanine	472	1.1	405	1.0
Proline	6,749	15.3	5,479	13.5
Serine	462.5	1.0	415.9	1.0
Theronine	568.5	1.3	499.9	1.2
Tryptophan	33	0.1	52.9	0.1
Tyrosine	1,486	3.4	1,373	3.4
Valine	1,507	3.4	1,594	3.9
Total	44,109	100.0	40,473	100.0
Imino	8,870	20.1	8,062	19.9

*ผลการวิเคราะห์จาก บ.ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ด้วยวิธี AOAC (2000) 994.12, 988.15 ด้วยเครื่อง GC/MS

4.5 การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนด้วย Electrophoresis (SDS-PAGE)

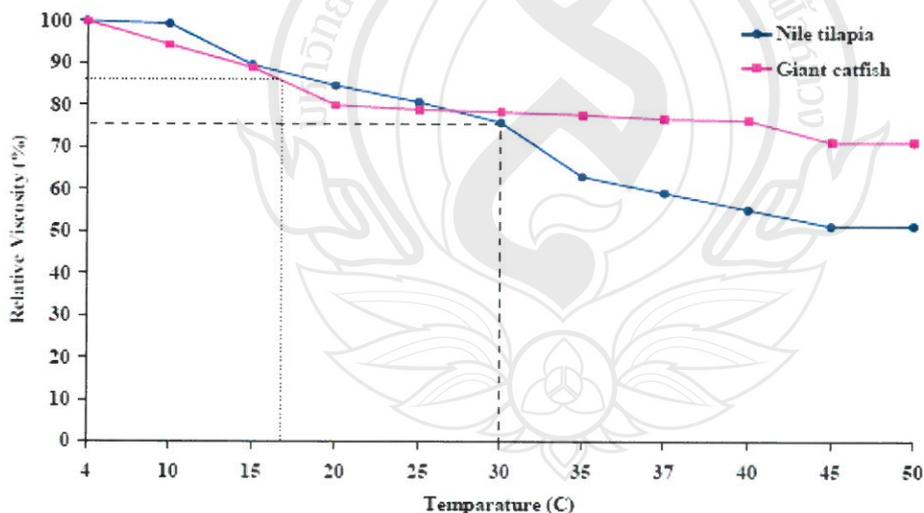
ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีนในคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสองในสภาวะ reducing และ non-reducing condition ที่ปริมาณโปรตีนตัวอย่างเท่ากัน (20 ไมโครกรัมต่อช่อง) แสดงไว้ในรูปที่ 2 โดยทั้งคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึกแสดงแถบของโปรตีน 3 แถบ คือ β -, α_1 -, α_2 - bands อย่างไรก็ตามความเข้ม (intensity) ของแถบโปรตีนแต่ต่างกันคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสอง โดยแถบ β -, α_1 ของคอลลาเจนปลานิลและคอลลาเจนมาตรฐานชัดเจนกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาบึก ส่วนแถบ α_2 ชัดเจนที่สุดเฉพาะในคอลลาเจนมาตรฐาน ดังนั้นผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาทั้งสองเป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยมีแถบโปรตีนทั้ง 3 แถบชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าในหนังปลาอื่นๆ เช่น ปลา Nile perch (Muyonga และคณะ, 2004) ปลา yellowfin tuna (Woo และคณะ, 2008) ปลา brownstripe red snapper (Jongjareonrak และคณะ, 2005) และปลา bigeye snapper (Kittiphattanabawan และคณะ, 2005) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนในสภาวะ reducing และ non-reducing condition พบว่ารูปแบบของโปรตีนในคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสองทั้งสองสภาวะไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนเหล่านี้ไม่มีพันธะ disulfide bond เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Nile perch (Muyonga และคณะ, 2004) ปลา brownstripe red snapper (Jongjareonrak และคณะ, 2005) และปลา bigeye snapper (Kittiphattanabawan และคณะ, 2005)



รูปที่ 2 รูปแบบโปรตีน (SDS-PAGE) ของคอลลาเจนจากหนังปลานิล (1-2) และหนังปลาบึกเลี้ยง (3-4) ภายใต้สภาวะ reducing (a) และ non-reducing conditions (b): M= molecular markers, Com= คอลลาเจนมาตรฐาน

4.6 วิเคราะห์หาความหนืด (Viscosity of collagen solution)

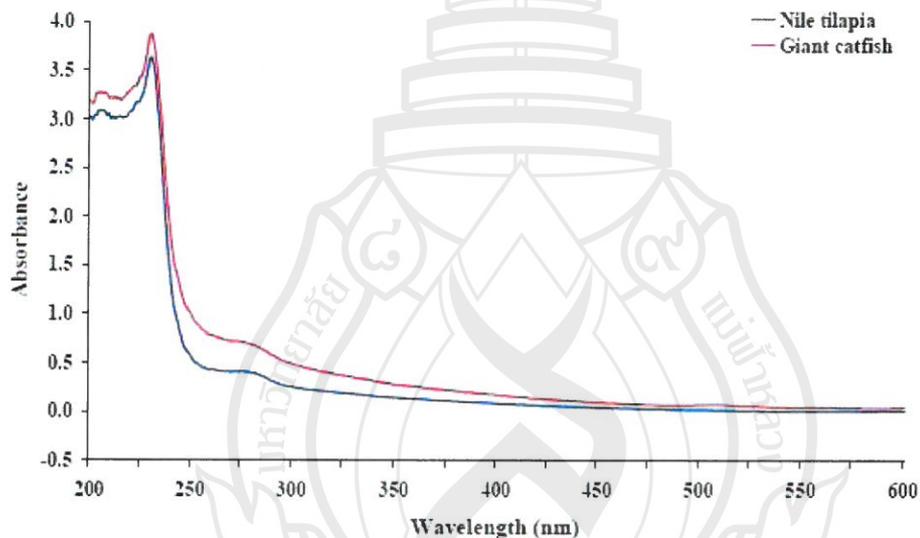
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดของสารละลายคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิแสดงในรูปที่ 3 โดยอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนเปลี่ยนแปลงความหนืดไปครึ่งหนึ่ง (T_D) ในคอลลาเจนหนังปลานิล (30 องศาเซลเซียส) สูงกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาบึก (17 องศาเซลเซียส) และความหนืดของคอลลาเจนหนังปลานิลลดลงด้วยอัตราคงที่จนถึงอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นอัตราการลดลงของความหนืดลดลงตั้งแต่ 37-50 องศาเซลเซียส ในขณะที่คอลลาเจนจากหนังปลาบึก ความหนืดลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง 20 องศาเซลเซียส และอัตราการลดลงของความหนืดช้าลงในช่วง 20-50 องศาเซลเซียส โดยการเสียสภาพของคอลลาเจน (Denaturation of collagen) จากความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความหนืดของสารละลายคอลลาเจน (Nagai and Suzuki, 2002; Kittiphattanabawan และคณะ, 2005) แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนหนังปลาทั้งสองเสียสภาพมีค่าต่ำกว่าการศึกษาที่ผ่านมาในคอลลาเจนจากปลาอื่นๆ เช่น ปลา Nile perch (36.5 องศาเซลเซียส) (Muyonga และคณะ, 2004) นอกจากนี้แนวโน้มการลดลงของความหนืดในคอลลาเจนหนังปลานิลคล้ายกับการศึกษาในปลา yellowfin tuna โดยมีอัตราการลดลงคงที่จนถึง 32 องศาเซลเซียส (Woo และคณะ, 2008) และปลา bigeye snapper ซึ่งมีอัตราการลดลงคงที่จนถึง 30 องศาเซลเซียส (Kittiphattanabawan และคณะ, 2005)



รูปที่ 3 แนวโน้มการเสียสภาพ (Denaturation curves) ของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึกเลี้ยง

4.7 การวิเคราะห์ Spectra absorption

ผลการศึกษาการดูดกลืนแสง UV (UV absorption spectrum) ของคอลลาเจนหนังปลานิลและหนังปลาบึกแสดงในรูปที่ 4 โดยคอลลาเจนทั้งสองที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร และมีการดูดกลืนเล็กน้อยที่ 273-285 นาโนเมตร ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า คอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาบึกมีกรดอะมิโน tyrosine และ phenylalanine น้อย โดยไม่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 280 นาโนเมตร (Lin and Liu, 2006) ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาในปลา channel catfish (Liu และคณะ, 2007) ปลา walleye Pollock (Yan และคณะ, 2008) ปลานิล (Kittiphattanabawan และคณะ, 2010) และปลา carp (Duan และคณะ, 2009) ที่แสดงการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ 230 นาโนเมตร ซึ่งเป็นลักษณะของ Triple-helical collagen (Duan และคณะ, 2009)

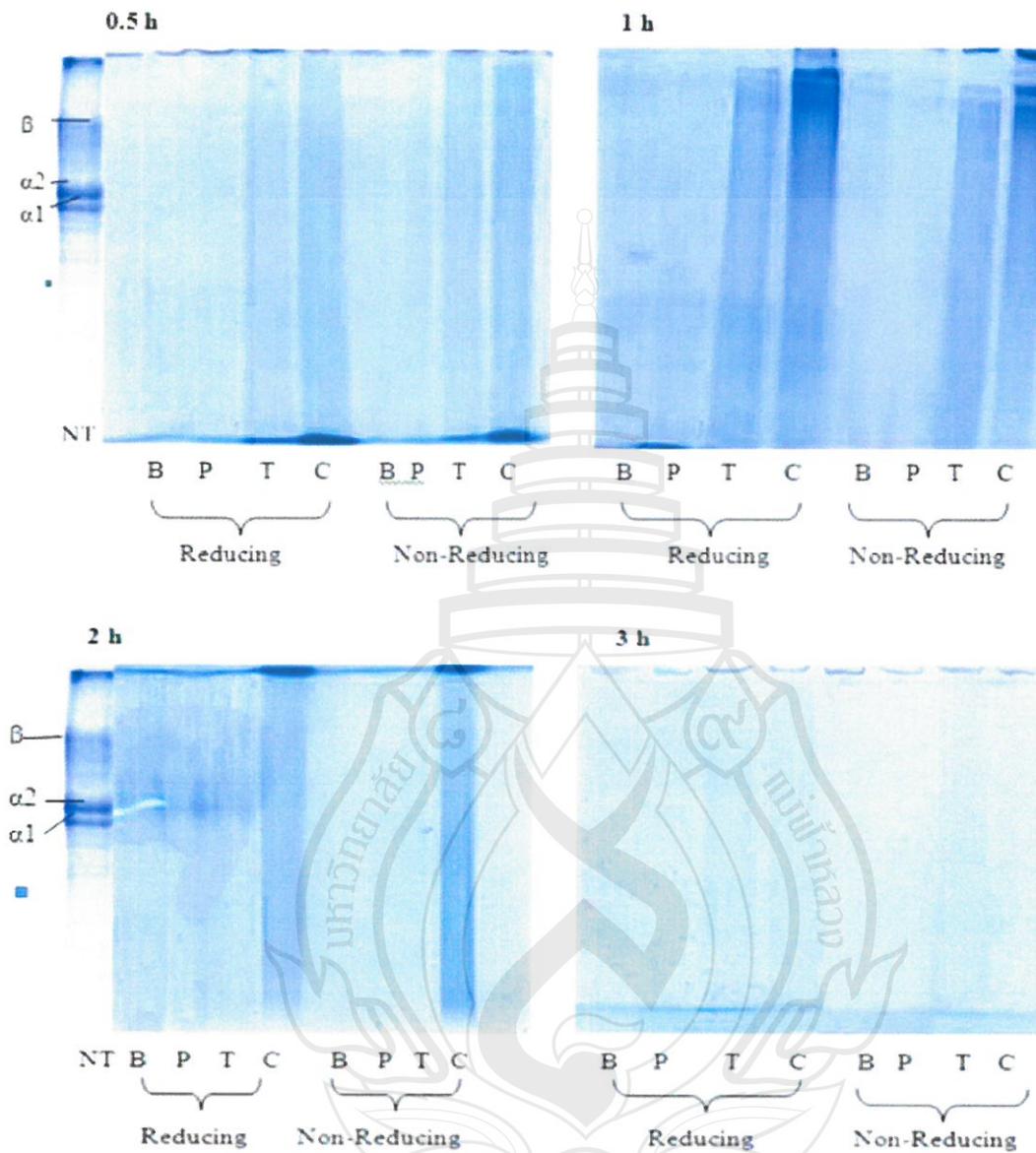


รูปที่ 4 การดูดกลืนแสง (UV-visible spectra) ของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึก

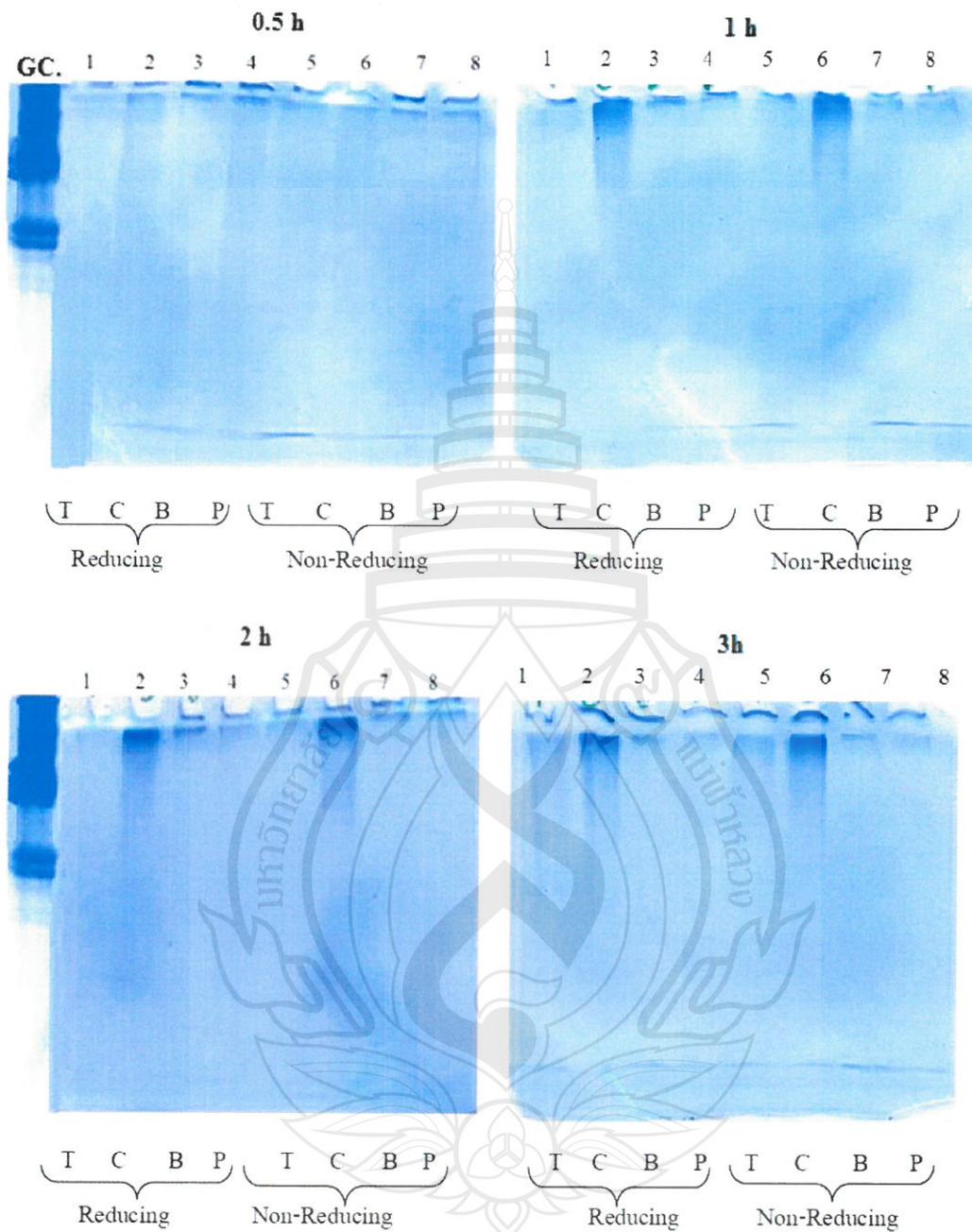
เลี้ยง

4.8 การเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซต (Collagen hydrolysate) ด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด

คอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยงถูกนำย่อยเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด (เอนไซม์ Bromelain, Papain, Trypsin และ เอนไซม์จากยางรัก *Calotropic procera*) เวลา 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาในรูปแบบโปรตีนไฮโดรไลเซตแสดงให้เห็นว่า ทั้งคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากหนังปลานิลและหนังปลาบึกที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ที่เวลาแตกต่างกัน ให้ผลเหมือนกันคือ แถบโปรตีนหลักของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ทั้ง 3 แถบโปรตีน (β -, α_1 -, α_2 - bands) หายไป ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ที่ใช้ศึกษาทั้ง 4 ชนิดที่สภาวะการย่อยในการศึกษาครั้งนี้สามารถย่อยคอลลาเจนไปเป็นโมเลกุลที่เล็กลงได้ แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มและตำแหน่งของแถบโปรตีนคอลลาเจนไฮโดรไลเซตแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างที่ถูกเอนไซม์แต่ละชนิดย่อย โดยคอลลาเจนไฮโดรไลเซตหนังปลานิลที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Trypsin และเอนไซม์จากยางรัก (*Calotropic procera*) ทุกช่วงเวลาการสกัด (รูปที่ 5) แสดงแถบโปรตีนที่เข้มกว่าเอนไซม์อื่น ส่วนคอลลาเจนไฮโดรไลเซตของปลาบึกเลี้ยงเฉพาะที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากยางรัก (*Calotropic procera*) ทุกช่วงเวลาการสกัดแสดงแถบที่เข้มกว่าเอนไซม์อื่น ๆ (รูปที่ 6) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนคอลลาเจนไฮโดรไลเซตระหว่างสภาวะ reducing และ non reducing จากปลาทั้งสองพบว่า รูปแบบโปรตีนจากคอลลาเจนไฮโดรไลเซตหนังปลาทั้งสองทั้งสภาวะทั้งสองไม่แตกต่างกันที่เอนไซม์และเวลาย่อยเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลรูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนหนังปลาทั้งสองข้างต้น (รูปที่ 5-6)



รูปที่ 5 รูปแบบโปรตีน SDS-PAGE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากหนังปลานิลด้วยเอนไซม์ Bromelain (B), Papain (P), Trypsin (T) และเอนไซม์จากยางรัก (*Calotropis procera*) (C) ที่เวลา 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่สภาวะ Reducing และ Non-reducing conditions



รูปที่ 6 รูปแบบโปรตีน SDS-PAGE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากหนังปลาน้ำเค็ม ด้วย เอนไซม์ Bromelain (B), Papain (P), Trypsin (T) และเอนไซม์จากยางรัก (*Calotropis procera*) (C) ที่เวลา 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่สภาวะ Reducing และ Non-reducing conditions.

4.8.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเซท

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทของหนังปลานิลและปลาบึกเลี้ยงด้วยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดที่เวลาต่างๆ (0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง) แสดงดังตารางที่ 4 ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลานิลมีค่าระหว่าง 3.77 ถึง 12.38 mg TEAC/g dry weight ในขณะที่คอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลาบึกมีค่าระหว่าง 2.33 ถึง 7.56 mg TEAC/g dry weight นอกจากนี้สำหรับคอลลาเจนไฮโดรไลเซทปลานิลในช่วงเวลา 0.5-2 ชั่วโมง คอลลาเจนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ Bromelain ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์อื่นๆที่เวลาเดียวกัน (ตารางที่ 4) และพบฤทธิ์ดังกล่าวสูงที่สุดที่คอลลาเจนไฮโดรไลเซทปลานิลด้วย Bromelain ที่ 2 ชั่วโมง (12.38 mg TEAC/g dry weight) และฤทธิ์น้อยที่สุดคอลลาเจนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ Trypsin ที่ 0.5 ชั่วโมง (3.77 mg TEAC/g dry weight) ($p < 0.05$) ในขณะที่คอลลาเจนไฮโดรไลเซทของปลาบึกเลี้ยงที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดที่เวลา 1 ชั่วโมงให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเวลาอื่นๆ (0.5, 2 และ 3 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า สภาวะการเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงแตกต่างกันในคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึก โดยคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลานิลควรย่อยด้วยเอนไซม์ Bromelain เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่คอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลาบึกควรย่อยด้วยเอนไซม์ Papain หรือเอนไซม์จากยางรักเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซต

เอนไซม์ที่ใช้อยู่	เวลา (ชั่วโมง)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH scavenging activity (mg TEAC/ g dw)	
		คอลลาเจนไฮโดรไลเซต จากหนังปลานิล	คอลลาเจนไฮโดรไลเซต จากหนังปลาบึกเลี้ยง
		เอนไซม์ Bromelain	0.5
	1	8.42 ± 0.34 ^{bc}	6.31 ± 0.18 ^a
	2	12.38 ± 1.28 ^d	2.92 ± 0.99 ^b
	3	6.69 ± 0.45 ^c	5.10 ± 0.99 ^{a,b}
เอนไซม์ Papain	0.5	7.22 ± 0.97	2.39 ± 0.17 ^c
	1	7.52 ± 0.03	7.16 ± 0.37 ^a
	2	8.51 ± 0.80	6.95 ± 0.21 ^a
	3	9.12 ± 0.30	4.93 ± 0.16 ^b
เอนไซม์ Trypsin	0.5	3.77 ± 0.68	5.18 ± 0.26 ^{a,b}
	1	5.33 ± 0.16	5.45 ± 0.68 ^a
	2	4.80 ± 0.59	2.33 ± 0.13 ^c
	3	5.61 ± 0.15	3.88 ± 0.10 ^b
เอนไซม์จากยางรัก (<i>Calotropis procera</i>)	0.5	8.78 ± 0.23 ^a	4.80 ± 0.96 ^{a,b}
	1	4.85 ± 0.40 ^b	7.46 ± 1.02 ^a
	2	8.50 ± 0.06 ^a	3.08 ± 0.53 ^b
	3	4.79 ± 1.05 ^b	4.99 ± 0.98 ^{a,b}

ตัวอักษรยกบนค่าภายในแถวเดียวกัน (Mean ± S.D.; n=3) ในแต่ละเอนไซม์ แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ANOVA), หากข้อมูลแถวใดในแต่ละเอนไซม์ไม่มีตัวอักษรยกแสดงให้เห็นถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 การสรุปผลการวิจัย

คอลลาเจนสามารถสกัดได้จากหนังปลานิลและหนังปลาบึกเลี้ยงโดยวิธีสกัดด้วยกรด ซึ่งคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลานิลและหนังปลาบึกมีปริมาณ 28.5% และ 8.5% (wet basis) ตามลำดับ ซึ่งคอลลาเจนเหล่านี้เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ไม่มีพันธะ disulfide bond โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโน Glycine และ Proline และคอลลาเจนจากปลาบึกมีปริมาณกรดอะมิโน Hydroxyproline มากกว่าคอลลาเจนจากหนังปลานิล และจากการศึกษาการเสียสภาพ (Denaturation) ของคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสอง พบว่าอุณหภูมิที่คอลลาเจนเปลี่ยนแปลงความหนืดไปครึ่งหนึ่ง (T_d) จากหนังปลานิล ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) สูงกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาบึกเลี้ยง ($17\text{ }^{\circ}\text{C}$) และการศึกษาการดูดกลืนแสง UV ของคอลลาเจนทั้งสองพบว่า คอลลาเจนทั้งสองไม่พบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่งแสดงว่าคอลลาเจนทั้งสองประกอบด้วยกรดอะมิโน tyrosine และ phenylalanine ปริมาณน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาองค์ประกอบอะมิโนในคอลลาเจนทั้งสอง ดังนั้นหนังปลานิลและหนังปลาบึกสามารถถูกใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกที่ดีในการสกัดคอลลาเจน เพื่อทดแทนการสกัดจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีข้อจำกัดทางด้านภาระของเชื้อโรคและศาสนา นอกจากนี้คอลลาเจนทั้งสองสามารถนำมาเตรียมเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเซตได้โดยใช้เอนไซม์ Bromelain, Papain, Trypsin และเอนไซม์จากยางรัก (*Calotropis procera*) และคอลลาเจนไฮโดรไลเซตที่ได้เหล่านี้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH scavenging activity แต่อย่างไรก็ตามสภาวะการเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงแตกต่างกันในคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาบึก โดยคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากหนังปลานิลควรย่อยด้วยเอนไซม์ Bromelain เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่คอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากหนังปลาบึกควรย่อยด้วยเอนไซม์ Papain หรือเอนไซม์จากยางรักเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

นำคอลลาเจนและคอลลาเจนไฮโดรไลเซตนำมาเป็นสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อาหาร และอื่น ๆ และสามารถนำมาทดแทนคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีข้อจำกัดในการเป็นพาหนะนำโรคสู่มนุษย์และทางศาสนา

5.2.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยเพิ่มเติม

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพคอลลาเจนไฮโดรไลเซตของหนังปลาทั้งสองควรศึกษาฤทธิ์อื่น ๆ รวมด้วย เช่น Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ Lipid peroxidation activity พร้อมศึกษาประสิทธิภาพด้วย Clinical trial



เอกสารอ้างอิง

- AOAC. (1999). *Official Methods of Analysis*. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.
- Bancroft, J.D., & Gamble, M. (2002). *Theory and Practice of Histological Techniques* Churchill Livingstone: New York.
- Bergman, I., & Loxley, R. (1963). Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Analytical Chemistry*, 35: 1961-1965.
- Cho, S. M., Kwak, K. S., Park, D. C., Gu, Y. S., Ji, C. I., Jang, D. H., Lee, Y. B., & Kim, S. B. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocolloids*, 18: 573-579.
- Cho, S. H., Jahneke, M. L., Chin, K. B., & Eun, J. B. (2006). The effect of processing conditions on the properties of gelatin from skate (*Raja Kenojei*) skins. *Food Hydrocolloids*, 20: 810-816.
- Department of Fisheries of Thailand. (2010a). Fisheries statistics of Thailand. Bangkok: Department of Fisheries of Thailand. Available from: <http://www.fisheries.go.th/it-stat/>. Accessed April 27, 2010 (in Thai).
- Department of Fisheries of Thailand. (2010b). Mekong giant catfish. Bangkok: Department of Fisheries of Thailand. Available from: <http://www.fisheries.go.th/sf-chiangrai/sara/GiantCatfish.htm>. Accessed June 24, 2010 (in Thai).
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112: 702-706.
- Eastoe, J.E. (1955). The amino acid composition of fish collagen and gelatin. *Biochemical Journal*, 61: 589-600.
- Elliott, D.G. (2000). Integumentary system. In: Ostander G.K. Ed., *The Laboratory Fish*. Academic Press: Britain. Pp. 95-107.
- Gomez-Gullen, M.C., Turnay, J., Fernandez-Diaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A., & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species : a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16 : 25-34.
- Guellec, D.L., Morvan-Dubois, G., & Sire, J. (2004). Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Donio rerio*). *International Journal of Developmental Biology*, 48: 217-231.
- Hawkes, J.W. (1974). The structure of fish skin I. general organization, *Cell and Tissue Research*, 149: 147-158.
- Improta, R., Benzl, C., & Barone, V. (2001). Understanding the role of stereoelectronic effects in determining collagen stability, I A quantum mechanical study of proline, hydroxyproline, and fluoroproline dipeptide analogue in aqueous solution. *Journal the American Chemical Society*, 123: 12568-12577.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93: 475-484.

- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Prodpran, T., & Tanaka, M. (2006a). Characterization of edible film from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocolloids*, 20: 492-501.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2006b). Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, 20: 1216-1222.
- Khantaphant, S. & Benjakul, S. 2008. Comparative study on the protease from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 151: 410-419.
- Kittiphattanabawan, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89: 363-372.
- Kittiphattanabawan, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. & Shahidi, F. (2010). Isolation and characterization of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 119: 1519-1529.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Li, G.Y., Fukunaga, S., Takenouchi, K., & 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., Lin, D., & Guo, S. (2007). Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chemistry*, 101: 621-625.
- Muyonga, J. H., Cole, C.G.B., & Duadu, K.G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 85: 81-89.
- Nagai, T., & Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68: 277-281.
- Puglises, P.T. (2006). *Physiology of the skin II*. Allured Publishing Corporation: Illinois.
- Sato, K., Yomagida, K., Wada, T., Yorihuzi, T., Nishimune, Y., Hosokawa, N., & Nagata, K. (2002). Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 37678-37684.
- Shoulders, M.D., & Raines, R.T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 929-958.
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S. and Kishimura, H. (2011). Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124: 97-105.
- Swatschek, D., Schatton, W., Kellermann, J., Muller, W.E.G., & Kruter, 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.

- Tabarestani, S., Maghasoudlou, Y., Motamedzadegan, A., Sadeghi M.A.R., & Rostamzad, H. (2012). Study on some properties of acid-soluble collagens isolated from fish skin and bones of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *International Food Research Journal*, 19: 251-257.
- Teglia, A., & Secchi, G. (1999). Proteins in cosmetics. In: *Principles of Polymer Science and Technology in Cosmetics and Personal Care*. Goddard, E.D. & Gruber, J.V., Eds. Marcel Dekker: New York., 391-464.
- Thitipramote, N., Chaiwut, P., Pintathong, P., & Rawdkuen, S. 2010. Characteristics and Bioactivities of Gelatin Hydrolysate from Beef Skin. Proceeding of the TSB 2010 International Conference on Biotechnology for Healthy Living. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, 20-22 October, 2010.
- Verdier-Sevrain, S., Bonte, F., & Gilchrist, B. (2006). Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Experimental Dermatology*, 15: 83-94.
- Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., & Hu, Q. (2008). Isolation and characterization of collagen from skin, scale, bone of deep-sea redfish (*Sebastes metella*). *Food Chemistry*, 108: 616-623.
- Wongwien, W., Srichan, N., Rawdkuen, S., & Thitipramote, N. 2010. Extraction and Characterization of Acid-soluble Collagen from Skin of Striped Catfish (*Pangasiandon hypophthalmus*). Proceeding of the International Conference on Agriculture and Agro-Industry (ICAAI 2010): Food, Health and Trade. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand, 19-20 November, 2010.
- Woo, J.W., Yu, S.J., Cho, S.M., Lee, Y.B., & Kim, S.B. (2008). Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocolloids*, 22: 879-887.
- Yang, J.I., Ho, H.Y., Chu, Y.J. & Chow, C.J. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110: 128-136.
- Zhuang, Y., Hou, H., Zhao, X., Zhang, Z., & Li, B. (2009). Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Phopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation. *Journal of Food Science*, 74: H183-H188.

ภาคผนวก
ผลงานวิจัยที่เผยแพร่
(การตีพิมพ์และการนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการต่างๆ)





PROPAK
ASIA 2010



Food Innovation Asia Conference 2010:
Indigenous Food Research and Development to Global Market,
June 17-18, 2010, BITEC, Bangkok, THAILAND

SP7-07

Characterization of acid-soluble collagen from Nile tilapia and farmed giant catfish skins

Natthawut Thitipramote^{1*} and Saroat Rawdkuen²

¹School of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai, 57100, Thailand.

²Food Technology Program, School of Agro-Industry, Mae Fah Luang University,
Muang, Chiang Rai, 57100, Thailand.

*Corresponding author. Tel: +66-5391-6837. Fax: +66-5391-6831.

*Corresponding e-mail address: natthawut.thi@mfu.ac.th

ABSTRACT

Collagen was extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*; NT) and farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*; GC) by using acid solubilization process. The morphology of fish skin, proximate composition and collagen recovery were performed. SDS-PAGE pattern, viscosity and UV-visible spectra absorption of the collagen were also determined. Morphological structure of NT skin showed the fine and loose bundles structure when compared with GC skin. The extraction yield of collagen from NT skin (28.5%) was significantly higher than that of GC skin (8.5%). The collagen had high protein content (86-94%) with being significantly the highest in NT skin ($p < 0.05$), but low fat (0.1-3.4%), moisture (3.3-4.8%) and ash content (0.1-0.2%). The SDS-PAGE patterns of NT and GC collagens showed high band intensity for the major protein compositions, especially α - and β -components. The temperature at which the change in viscosity was half completed in the collagen solution was about 30°C and 17°C for NT and GC, respectively. UV-visible spectra of both collagens showed the same peak at around 230 nm. The fish skins of the Nile tilapia and farmed giant catfish could be used as an alternative source for collagen extraction. Nile tilapia skin provided higher collagen recovery and protein content than that of giant catfish skin.

Keywords: acid-soluble collagen, fish skin, Nile tilapia, giant catfish

Introduction

Collagen is the most abundant structural protein found ubiquitously in body including skin that constitutes ~30% of total animal protein (Muyonga *et al.*, 2004). In industrial, collagen is the value added product obtained from by-product. It is a very important natural material in medicine, cosmetic and also in food industry. Collagens used in commercial products are mainly obtained from cattle and swine. However, the use of mammalian collagen has limited by the spread the animal disease to human such as the mad-cow disease and the foot/mouth disease. Thus, the finding of new materials for collagen extraction has been investigated, especially in fishery industries. About 30% of the wastes consist of skin and bone, which are very rich in collagen (Gomez-Guillen *et al.*, 2002). Recently, the collagen extraction from the skin, fin and bone of marine fish has been broadly studied (Jongjareonarak *et al.*, 2005; Kittiphattanabawon *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2008), but not in case of the freshwater fish. In Thailand, the freshwater fish that are widely cultured for trade has little been investigated for collagen extraction. The Nile tilapia is the one of importantly farmed economic fish (value ~7.8 billion bath in year 2007) in the north of Thailand, especially in Chaing Rai province (~38,538 ton in same year). In addition, farmed giant catfish has become an economically important (Department of Fisheries of Thailand, 2010). Beside freshwater fish processing, by-



PROPAK
ASIA 2010



products are generated according to the fish was consumed. Moreover, they may causes of environmental pollution if they have no further process to eliminate them. Therefore, the objectives of this study are to investigate the characteristics of acid-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia and farmed giant catfish. Utilization of freshwater fish industry by-products as a material for value-added product preparation would be useful.

Materials and Methods

Materials

Acetic acid and sodium hydroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals for electrophoresis and microscopic observation were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Nile tilapia and farmed giant catfish were obtained from Charan Farm in Chiang Rai, Thailand. Commercial collagen from bovine achilles tendon (C9879-5G) was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Methods

1. Fish skin preparation

Frozen skins of Nile tilapia and farmed giant catfish were thawed and washed with running tap water. The residual meat in fish skin was removed manually and cleaned samples were washed with tap water and drained. The skin was then cut into small pieces (0.5x0.5 cm) and placed in a polyethylene bag. The prepared skin was stored at -20°C until used.

2. Fish skin morphology and ultrastructure

Fish skins of fish samples were prepared for histology. For light microscopy, the small pieces of fish skins were fixed in neutral formalin and processed for paraffin sectioning (Bancroft and Gamble, 2002). The skins were sectioned at about 6 µm using rotary microtome, sections were stained with haematoxylin and eosin, and examined by light microscopy (LM) at 400x and 1000x magnifications.

For the scanning electron microscopy (SEM), the fish skins with a thickness of 2–3 mm were rapidly fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2). They were then dehydrated with a graded series of ethanol, critical-point dried and coated with gold (Sputter coater, SC7620, Polaron, UK). The ultrastructure of fish skins was investigated with a SEM (LE01450VP, Cambridge, UK).

3. Collagen extraction

The collagens were extracted following the method of Kittiphattanabawon *et al.* (2005) with a slight modification. All preparation procedures were performed at 4°C.

3.1 Preparation of skin for collagen extraction

To remove non-collagenous proteins, the skin was mixed with 0.1 N NaOH at a sample/alkaline solution ratio of 1:10 (w/v). The mixture was stirred for 6 h with changing of the alkaline solution every 2 h. Then, the alkali-treated skins were washed with cold water until neutral pH of wash water was obtained. The treated skins were then



defatted with 10% butyl alcohol with a solid/solvent ratio of 1:10 (w/v) for 18 h. Defatted skins were washed with 10 volumes of cold water for three times.

3.2 Acid-solubilization process

Pretreated skin was soaked in 0.5 M acetic acid with a solid to solvent ratio of 1:15 (w/v) for 48 h with continuous stirring. The mixtures were filtered with two layers of cheesecloth. The collagen in the filtrate was precipitated by adding NaCl to a final concentration of 2.6 M in the presence of 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5. The resultant precipitate was collected by centrifugation at 20,000g at 4°C for 60 min. The pellet was dissolved in a minimum volume of 0.5 M acetic acid, dialyzed against 25 volumes of 0.1 M acetic acid for 12 h. Thereafter, it was dialyzed against 25 volumes of distilled water for 48 h. The resulting dialysate was freeze dried and referred to as “acid soluble collagen; ASC”.

4. Characterization of acid-soluble collagens

4.1 Proximate analysis

Fish skins and extracted collagen were subjected to proximate analyses, including moisture, ash, fat and protein contents, according to the AOAC (2000) method Nos. 950.46, 928.08, 960.39 and 920.153, respectively.

4.2 Yield

The yield of collagen (Y_c) was calculated by:

$$Y_c = \frac{(V_c \times C_c)}{W_t}$$

where V_c is the volume of extracted collagen solution in milliliter, C_c is the protein concentration of the same solution (g/mL), and W_t is the weight of the fish skin in gram. Each set of the test was done in duplicate.

4.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed by the method of Laemmli (1970). The collagens were dissolved in 0.02 M sodium phosphate containing 1% SDS and 3.5 M urea (pH 7.2) with continuous stirring at room temperature. The mixtures were centrifuged at 8,500g for 5 min to remove un-dissolved debris. Solubilized samples were mixed at 1:1 (v/v) ratio with the sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 4% SDS, 20% glycerol) in the presence (reducing) or absence (non-reducing) of 10% β -ME. Samples were loaded onto the polyacrylamide gel (7.5% gel) and subjected to electrophoresis at a constant current of 20 mA/gel by using a Mini Protean Tetra Cell unit. After electrophoresis, gels were stained with 0.05% (w/v) Coomassie blue R-250 in 15% (v/v) methanol and 5% (v/v) acetic acid and destained with 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid. Molecular weight markers were used to estimate the molecular weight of proteins. Commercial collagens were used as a reference.

4.4 Viscosity of collagen solution

Five hundred milliliter of 0.03% each collagen in 0.1 M acetic acid were subjected to viscosity measurements using a Brookfield viscometer with spindle No. 1 at a speed of 100 rpm. The solution was heated from 4°C to 50°C with a heating rate of 4°C /min. At the designated temperature, the solution was held for 30 min prior to viscosity determination. Measurement was carried out in triplicate. The relative viscosity was calculated in comparison to that obtained at 4°C. T_d was defined as the temperature causing 50% decrease in the relative viscosity of the collagen solution.

4.5 Spectra absorption

Each collagen was dissolved in 0.5 M acetic acid to obtain a concentration of 1 mg/ml. The solution was then subjected to UV-Vis measurement using a double-beam spectrophotometer (UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan). Prior to measurement, the base line was set with 0.5 M acetic acid. The spectrum was obtained by scanning the wavelength in the range of 220-600 nm with a scan speed of 50 nm/min.

5. Data analysis

The obtained data were statistically analyzed using the SPSS program for window (SPSS version 11.5, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and the differences were considered significant when $p < 0.05$. The comparison of the yield and proximate analysis data between the NT and GC collagens were analyzed by using independent t -test.

Results and Discussion

1. Proximate compositions and collagen recovery

The proximate compositions and extraction yield of collagen from NT and GC skins are shown in Table 1. The collagens contained protein as the major component (86-94%), followed by moisture (3.3-4.8%), fat (0.1-3.4%) and ash (0.1-0.2%). The NT collagen contained the highest protein content (94.55%) with high lipid content (3.42%) compared with the GC collagen (86.28%). NT fish skin had a lower protein content (26%) than that of GC skin (34%). For the result, the major component was protein for collagens and moisture for fish skins of NT and GC that was in accordance with those reported in bigeye snapper (Kittiphattanabawan *et al.*, 2005).

Table 1 Chemical composition and yield of collagen and fish skin from NT and GC

Compositions (%)	Collagen		Fish skin	
	Nile tilapia	Giant catfish	Nile tilapia	Giant catfish
Yield	28.50±2.35 ^a	8.48±0.18 ^b	-	-
Protein	94.55±0.27 ^a	86.28±0.4 ^b	26.55±1.26 ^a	34.03±0.54 ^b
Moisture	3.30±0.71	4.83±2.68	69.68±0.40 ^a	64.86±0.40 ^b
Lipid	3.42±0.65 ^a	0.12±0.04 ^b	4.40±0.86	2.69±1.65
Ash	0.16±0.02	0.08±0.01	0.20±0.00	0.25±0.01

Values (Mean ± S.E.) within a row followed by a different superscript differ statistically (independent t -test, $p < 0.05$).

The yield of collagen from NT skin (28.5%) was significantly higher than that of GC skin (8.5%) (wet basis). The yield of NT collagen was higher than the ASC from other fish skins e.g. bigeye snapper (10.94%), brownbanded bamboo shark (9.38%) (Kittiphattanabawan *et al.*, 2005; 2010) and brownstripe red snapper (9%) (Jongjareonrak *et al.*, 2005). The collagen obtained from GC skin contained no significant amount to the others. The difference of the extraction yield of collagen from both fish skins probably due to the different structure of skins used.



PROPAK
ASIA 2010

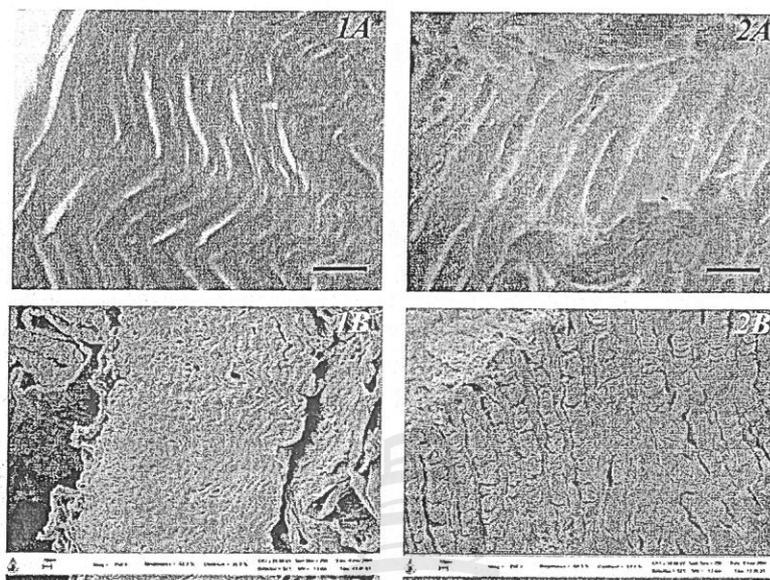


Figure 1 LM (A) and SEM (B) photomicrographs of Nile tilapia (1) and farmed giant catfish (2) skin. LM: scale bars =30 μ m (H&E staining); SEM magnification of 250x at acceleration voltage of 10 kV.

Histological structure and ultrastructure of NT and GC skin was shown in Figure 1. The NT skin had smaller bundles with order arrangement and looser structure than that of GC skin. Moreover, the two terminal ends (as non-helical part) of collagen play an important role in the cross-linked at the telopeptide region that the presence of high cross-linking among collagen lead to a decrease in the solubility of collagen in the acidic solution (Duan *et al.*, 2009; Kittiphattanabawon *et al.*, 2010). The results showed that the NT skin have a loose skin structure with having weaker cross-linking between collagen than that of GC and those other fishes (Jongjareonrak *et al.*, 2005; Kittiphattanabawan *et al.*, 2005; 2010).

2. Molecular weight distribution of collagens

The protein patterns of fish skin collagens under reducing and non-reducing conditions are presented in Figure 2. Three major bands were found in all samples, representing β -, α_1 , α_2 . However, the different band intensity of each source was observed that the high intensity of β and α_1 band was clearly observed in NT and commercial collagen (Com) rather than GC. The highest band intensity of α_2 was only occurred in Com. Therefore, the results indicated that type I collagen is a major component in collagen extracted from NT and GC fish skin. Characteristic for type I collagen β -, α_1 , α_2 components were also observed in skin collagen of Nile perch (Muyonga *et al.*, 2004), yellowfin tuna (Woo *et al.*, 2008) and brownstripe red snapper (Jongjareonrak *et al.*, 2005), and skin and bone collagens of bigeye snapper (Kittiphattanabawan *et al.*, 2005). Comparing between collagens under reducing and non-reducing conditions, the patterns of the samples were similar; indicating the absence of disulfide bonds in those collagens, although the intensity of these bands is slightly different. The results were in accordance with the previously reported from skin collagen of several other fish species e.g. Nile perch (Muyonga *et al.*, 2004), bigeye snapper (Kittiphattanabawan *et al.*, 2005) and brownstripe red snapper (Jongjareonrak *et al.*, 2005).



PROPAC
ASIA 2010

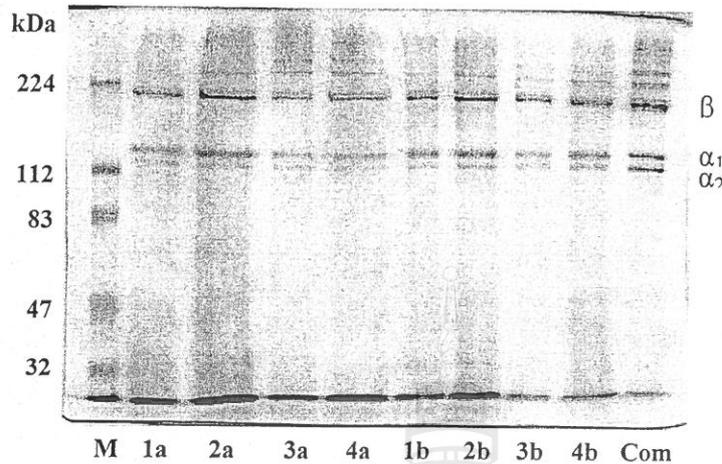


Figure 2 SDS-PAGE patterns of collagens from Nile tilapia skin (1-2) and farmed giant catfish skin (3-4) under reducing (a) and non-reducing (b) conditions. M: molecular weight markers; Com: commercial collagen.

3. Viscosity of collagen solution

The change in viscosity of NT and GC collagen solutions with increasing temperature was shown in Figure 3. The temperature at which the change in viscosity was half completed in skin collagen solutions was about 30°C and 17°C for NT and GC, respectively. The viscosity of NT collagen decreased at constant rate until 35°C, after which it continued to decrease more slowly in range of 37-50°C whereas the viscosity of GC decreased continuously on heating up to 20°C and the rate of decrease was retarded in the temperature range of 20-50°C. Denaturation of collagen structure caused by heat-treatment is associated with the change in viscosity (Nagai and Suzuki, 2002; Kittiphattanabawon *et al.*, 2005). The denaturation temperature of NT and GC collagens was lower than the values reported for those other fish species e.g. Nile perch (36.5°C) (Muyonga *et al.*, 2004). The tendency of decreasing viscosity of NT collagen was similar to skin collagen of other fish species such as yellowfin tuna (having constant decreased rate until 32°C) (Woo *et al.*, 2008) and bigeye snapper (occurring constant decreased rate until 30°C) (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005) but not in case of GC collagen.

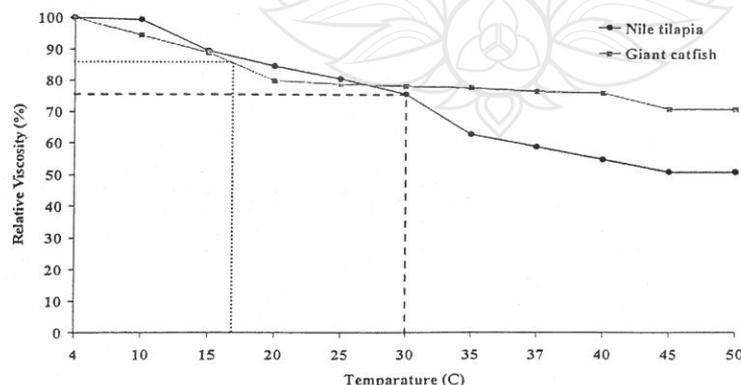


Figure 3 Denaturation curves of fish skin collagens of Nile tilapia and farmed giant catfish.

4. UV-visible spectra

The UV absorption spectrum of NT and GC collagens were shown in Figure 4. NT and GC collagens (1 mg/ml) had an absorption peak at 230 nm with occurring a small curve around 273-285 nm. It indicates that the NT and GC collagens had very low tyrosine and phenylalanine contents with no absorption peak at 280 nm (Lin and Liu, 2006). The result was accordance with results from skin collagen of channel catfish (Liu *et al.*, 2007), walleye pollock (Yan *et al.*, 2008), carp (Duan *et al.*, 2009) and shark (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010) that a same absorption peak at around 230 nm is characteristic for triple-helical collagen (Duan *et al.*, 2009).

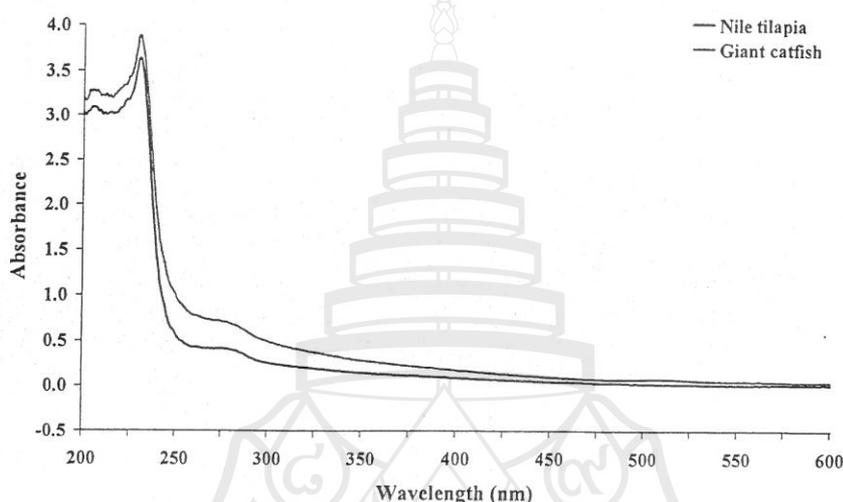


Figure 4 UV-visible spectra of acid-soluble collagens from Nile tilapia and farmed giant catfish.

Conclusions

Collagen could be successfully extracted from the skin of Nile tilapia and farmed giant catfish by acid solubilization with the yield of 28.5% and 8.5%, respectively. The collagens were characterized as type I without disulfide bond. Denaturation temperature of GC collagen was different from collagen of NT and other fishes. Based on the results, NT and GC skin can be used as an alternative source of collagen, besides mammals.

Acknowledgements

This work was in part funded by a grant from the Mae Fah Luang University. The authors also would like to thank Charun Farm for preparing the fish used in this experiment.

References

- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Bancroft, J.D., and Gamble, M. (2002). Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone: London.



PROPAK



- Department of Fisheries of Thailand. (2010). Fisheries statistics of Thailand. Bangkok: Department of Fisheries of Thailand. Available from : <http://www.fisheries.go.th/it-stat/>. Accessed April 27, 2010.
- 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 Chemistry, 112: 702-706.
- Gomez-Guillen, M.C., Turnay, J., Fernandez-Diaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A., and Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. Food Hydrocolloids, 16: 25-34.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., and Tanaka, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Chemistry, 93: 475-484.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., and Shahidi, F. (2010). Isolation and characterization of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). Food Chemistry, 119: 1519-1529.
- 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 head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Lin, Y.K., and Liu, D.C. (2006). Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. Food Chemistry, 99: 244-251.
- Liu, H., Lin, D., and Guo, S. (2007). Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Food Chemistry, 101: 621-625.
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., and Duodu, K.G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food Chemistry, 85: 81-89.
- Nagai, T., and Suzuki, N. (2002). Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. Food Chemistry, 76: 149-153.
- Woo, J.W., Yu, S.J., Cho, S.M., Lee, Y.B., and Kim, S.B. (2008). Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. Food Hydrocolloids, 22: 879-887.
- 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.

Histological Structure and Chemical Composition of the Farmed Giant Catfish's Skin

Natthawut Thitipramote^{1*}, Saroot Rawdkuen²

¹ Excellent Center for Cosmetic Research, School of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai, 57100, Thailand.

² Food Technology Program, School of Agro-Industry, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai, 57100, Thailand.

*Corresponding author, e-mail: natthawut.thi@mfu.ac.th

Abstract

Giant catfish (*Pangasianodon gigas*) is the world's largest freshwater catfish that has been successfully cultured in Chiang Rai, Thailand. It is highly consumed and become an economically important cultured freshwater fish due to their quality attributes (i.e. texture, colour and nutritive values). In addition, the fish are processed into various kinds of finished products and their by-products are generated such as blood, bone, head, viscera and also skin. The skin of farmed giant catfish (GC skin) takes account about 3.5-5.3% (w/w) of the whole fish. However, the information about the histological structure and chemical composition of this kind of fish skin has not been reported. Thus, the objective of this work was to study the structure of GC skin by using light and scanning electron microscopic techniques. Chemical composition and collagen content were also determined. The results showed that GC skin is composed of 2 parts: thin epidermis and thick dermis. The dermis was characterized by thinner stratum spongiosum and large stratum compactum as well as chromatophores on the apical and basal region of dermis. The collagen bundles and fibroblasts were found in the stratum compactum. The main compositions (wet basis) in the GC skin were water (64.86%) and protein (34.03%), while the lipid (2.69%) and ash content (0.25%) are the minor one. The collagen content extracted by acid solubilization process was about 8.48% (wet basis). However, after the first extraction process, the GC skin still contained the bundle form of stromal protein. This finding suggests that the GC skin could be used as an alternative source for collagen extraction. The obtained collagen could be use as an active ingredient in food, cosmetic, and pharmaceutical products.

Background

Fish skin is the envelope for the body that separates and protects the animal from its environment (osmotic pressure and physical force). The skin of a fish is a multifunctional organ and may serve important roles in protection, communication, sensory perception, locomotion, respiration, excretion and thermal regulation that their skin structure varies with fish species [1-2]. The giant catfish (GC: *Pangasianodon gigas*) is the world's largest freshwater catfish and is one of naked or scaleless fish with thick skin. Farmed giant catfish has been successfully cultured in Chiang Rai Province, Thailand and has thus become an economically important [3]. About 50 % of whole fish will be transformed into by-product during fillet processing and 30% of wastes consist of skin and bone which are rich in collagen [4]. Because the limitation of mammal collagen used (e.g. spread mammal disease and Halal food for Muslims and Jew), the fish skin (both in scale and thick skin species) is an alternative source of collagen [5-7]. Although they have many researchers reported about collagen extraction and characterization from fishery by-products, the relationship between skin structure, collagen and compositional content have not been yet investigated. In addition, the information about the

histological structure and chemical composition of giant catfish skin (GC skin) has not been reported. Therefore, the aims of this study were to study the structure of GC skin in farmed giant catfish by using light and scanning electron microscopic techniques and also to investigate the chemical composition and collagen content of GC skin.

Materials and Methods

Materials

Acetic acid and sodium hydroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals for microscopic observation were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Farmed giant catfish were obtained from Charan Farm in Chiang Rai, Thailand.

Methods

Fish skin preparation

Fish skin of giant catfish was removed manually. The cleaned samples were washed with tap water and drained. The skin was then cut into small pieces (0.5x0.5 cm) and placed in a polyethylene bag. The prepared skin was stored at -20°C until used.

Fish skin morphology and ultrastructure

GC skins were prepared for histology. For light microscopy (LM), the small pieces of fish skins were fixed in neutral buffer formalin and processed for paraffin sectioning [8]. The skins were sectioned at about 6 μm using rotary microtome. The sections were stained with haematoxylin and eosin and then examined by LM at 400x and 1000x magnifications.

For the scanning electron microscopy (SEM), the prepared skins with a thickness of 2–3 mm were rapidly fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2). They were then dehydrated with a graded series of ethanol, critical-point dried and then coated with gold (Sputter coater, SC7620, Polaron, UK). The ultrastructure of the skins was investigated by SEM (LE01450VP, Cambridge, UK).

Proximate analysis of fish skin

Fresh GC skins were subjected to proximate analyses, including moisture, ash, fat and protein contents according to the AOAC (2000) [9] method Nos. 950.46, 928.08, 960.39 and 920.153, respectively.

Collagen extraction

The collagen extraction and collagen content of GC skins was performed according to the method of Kittiphattanabawon et al. (2005) [6] with a slight modification. All preparation procedures were performed at 4°C.

Preparation of skin for collagen extraction

To remove non-collagenous proteins, the GC skin was mixed with 0.1 N NaOH at a sample/alkaline solution ratio of 1:10 (w/v). The mixture was stirred for 6 h with changing of the alkaline solution every 2 h. Then, the alkali-treated skins were washed with cold water until neutral pH of wash water was obtained. The treated GC skins were then defatted with 10% butyl alcohol with a solid/solvent ratio of 1:10 (w/v) for 18 h. Defatted skins were washed with 10 volumes of cold water for three times before subjected to the extraction process.

Acid-solubilization process

Pretreated GC skin was soaked in 0.5 M acetic acid with a solid to solvent ratio of 1:20 (w/v) for 48 h with continuous stirring. The mixtures were filtered with two layers of cheesecloth. The collagen in the filtrate was precipitated by adding NaCl to a final concentration of 2.6 M in the presence of 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5. The resultant precipitate was collected by centrifugation at 20,000g at 4°C for 60 min. The pellet was dissolved in a minimum volume of 0.5 M acetic acid, dialyzed against 25 volumes of 0.1 M acetic

acid for 12 h. Thereafter, it was dialyzed against 25 volumes of distilled water for 48 h. The resulting dialysate was freeze dried and referred to as “acid-soluble collagen; ASC”.

Collagen yield

The yield of collagen (Y_c) was calculated by:

$$Y_c = \frac{(V_c \times C_c)}{W_t}$$

where V_c is the volume of extracted collagen solution in milliliter (mL), C_c is the protein concentration of the same solution (g/mL), and W_t is the weight of the fish skin in gram (g). Each set of the test was done in duplicate.

Data analysis

The obtained data were statistically analyzed using the SPSS program for window (SPSS version 11.5, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and the differences were considered significant when $p < 0.05$. The comparison of the proximate analysis data between the giant catfish (GC skin) and the striped catfish (SC skin) were analyzed by using independent t -test.

Results and Discussion

Histological structure of giant catfish skin

Histological structure and ultrastructure of GC skin are shown in Fig. 1a-c. The GC skin composed of 2 parts: very thin epidermis (~20 μm thickness) and thick dermis (~0.94 mm thickness). The thickness of the epidermis (E) varies with fish species, age, and different regions of the body and environment condition of their fish living [2]. In naked fish species, such as GC and other catfish, the dermis is generally thicker (0.6-2.0 mm) than in scaled species (e.g. < 0.2 mm in Zebrafish) [11]. The dermis (D) of GC skin was characterized by thinner stratum spongiosum (SS; ~200 μm thick) and large stratum compactum (SC; ~740 μm thick) as well as chromatophores (C) on the apical and basal region of dermis (Fig. 1a). The relative thickness of the two dermal layers depends on the presence or absence of scale and varies with fish species [1-2]. The fibroblasts (F) were also found in the stratum compactum of dermal layer as presented with the blue spot in Fig. 1b, like in the sole fish [1].

The stromal proteins bundles of GC skin under scanning electron microscope were clearly observed in Fig. 1c. The big bundles with order arrangement were found in GC skin. The compact arrangement of the bundle provides information about the strength and hardness of the fish skin. Moreover, it can be hypothesized to the main chemical and structural compositions of the skin. In general, the animal skin composes of collagen as a major component. Its parent form, collagen, constitutes approximately 30% of total animal

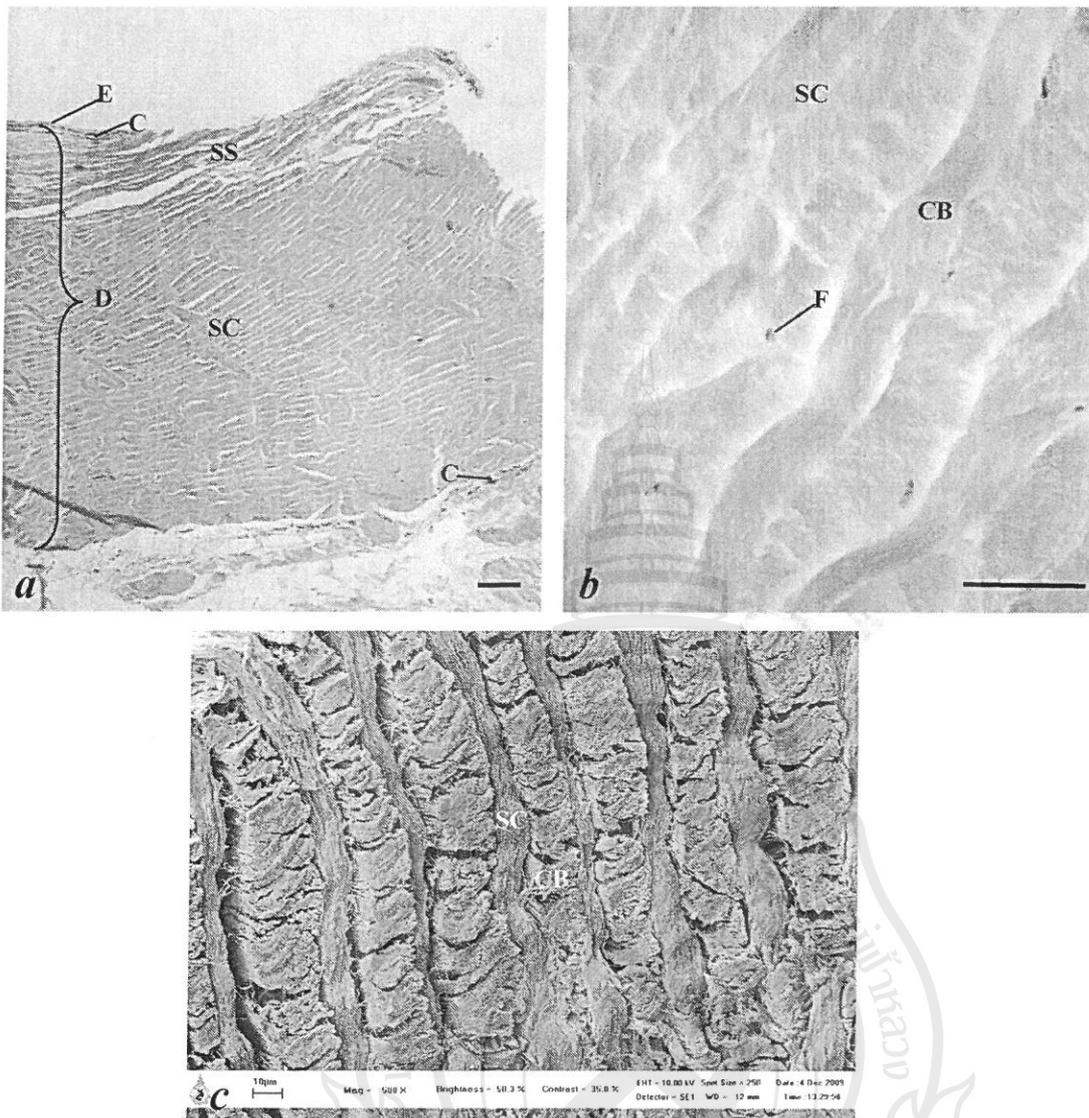


Figure 1 LM (*a* and *b*) and SEM (*c*) micrographs of the GC skin. E=Epidermis; C= Chromatophores; CB=Collagen bundle; D=Dermis; F=Fibroblast; SC=Stratum compactum; SS=Stratum spongiosum. LM: Scale bars=100 μ m (*a*) and 50 μ m (*b*) (H&E staining); SEM magnification of 500x at acceleration voltage of 10 kV.

protein. Skin, bones, the vascular system, tendons and the connective tissue sheaths surrounding muscle are the major sources of collagen. The bundles with three lines (horizontal, longitudinal and vertical planes) were found in the stratum compactum (Fig. 1c). These characteristics also found in some naked catfish species [11]. The stratum compactum is important in locomotor activity that acts as a tendon in parallel with the muscle of fish [2]. These results might be given the different extraction yield of fish skin collagen and provided the different contents of compositions.

Proximate compositions and collagen recovery

The proximate compositions of the GC skin and the extraction yield of collagen are shown in Table 1. The information on these components of SC skin was also presented and compared. The GC skin contained the higher protein content (34%) with the low lipid content (2.69%) compared with SC skin (27%) [10]. The yield of GC acid-soluble collagen (ASC) (8.5%) was lower than the ASC from SC skin (10.2%), channel catfish (25.8%) [12], large fin long barbel catfish (16.8%) [13] and other fish skin e.g. the brownbanded bamboo shark (9.38%) [7] and brownstripe red snapper (9%) [5]. Carp skin, the extractability of acid soluble collagen was 41.3% (dry weight basis), which is quite different

from some marine species. The yields of ASC from the skin of ocellate puffer fish and cuttlefish were low (10.7% and 2%, respectively, dry weight basis). However, for some other species, the yields of ASC were high and the value were about 51.4% (Japanese sea-bass), 49.8% (chub mackerel), and 50.1% (bullhead shark), respectively (on the basis of dry weight) [7].

The variation of the extraction yield of collagen from fish skins probably due to the different structure of skin used, especially the age of harvested fish. Moreover, the two terminal ends (as non-helical part) of collagen play an important role in the cross-linked at the telopeptide region that the presence of high cross-linking among collagen lead to a decrease in the solubility of collagen in the acidic solution [7, 14]. The results showed that the GC skin have a dense skin structure with having stronger cross-linking between collagen than that of SC and those other fishes [5-7, 13].

Table 1 Yield of collagen and chemical composition of GC and SC skins.

Composition (%)	Fish skin	
	Giant Catfish	Striped Catfish*
Extraction yield of collagen	8.48	10.2
Protein	34.03±0.77 ^a	27.26±0.28 ^b
Moisture	64.86±0.57 ^a	51.85±0.40 ^b
Lipid	2.69±2.33 ^b	20.24±0.59 ^a
Ash	0.25±0.01	0.23±0.03

Values (Mean±S.D.) within a row followed by a different superscript differ statistically (independent t test, $p < 0.05$).

*From previous study [10]

Nowadays, there are many commercially available collagen containing products, such as food, drink, cosmetics and health food supplement. Fish collagen, a type-I/III collagen peptide from fish skin, has been paid increasing attention as an alternative to its mammalian counterpart, because fish collagen is free from a risk of pathogens such as bovine spongiform encephalopathy.

Conclusion

Collagen could be successfully extracted from the farmed giant catfish by acid solubilization with the yield of 8.5%. The low extraction yield collagen of GC skin may caused by their skin structure with having the large and dense collagen bundles in stratum compactum of dermis.

Therefore, GC skin can be used as an alternative source of collagen, besides mammals.

Acknowledgements

This works was in part funded by a grant from the Mae Fah Luang University. The authors also would like to thank Charun Farm for fish specimen in this experiment.

References

1. J.W. Hawkes, The structure of fish skin I. general organization, *Cell Tiss. Res.* 149, 147-158 (1974).
2. D.G. Elliott, Integumentary system, in: G.K. Olander (Ed.), *The Laboratory Fish*, Academic Press, Britain, 2000, 95-107.
3. Department of Fisheries of Thailand, Fisheries statistics of Thailand, Department of Fisheries of Thailand, Bangkok, Available from: <http://www.fisheries.go.th/it-stat/>, Accessed April 27, 2010.
4. M.C. Gomez-Guillen, J. Turnay, M.D. Fernandez-Diaz, N. Ulmo, M.A. Lizarbe, P. Montero, Structure and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study, *Food Hydrocolloids* 16, 25-34 (2002).
5. A. Jongjareonrak, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, M. Tanaka, Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*), *Food Chemistry* 93, 475-485 (2005).
6. P. Kittiphattanabawon, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, M. Tanaka, Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*), *Food Chemistry* 89, 363-373 (2005).
7. P. Kittiphattanabawon, S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura, F. Shahidi, Isolation and characterization of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*), *Food Chemistry* 119, 1519-1529 (2010).
8. J.D. Bancroft, M. Gamble, *Theory and Practice of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, London, 2002.
9. AOAC, *Official Method of Analysis*, 17th ed., Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC, 2000.
10. W. Wongwien, N. Srichan, S. Rawdkuen, N. Thitipramote, Extraction and characterization of acid-soluble collagen from skin of Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), in *Proceeding of the International Conference on Agriculture and Agro-Industry (ICAAI 2010): Food, Health and Trade*, Mae Fah Luang University, Thailand, November 19-20, 2010.

11. D.L. Guellec, G. Morvan-Dubois, J. Sire, Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Donio rerio*), *Int. J. Dev. Biol.* 48, 217-231 (2004).
12. H. Liu, D. Lin, S. Guo, Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Food Chemistry*, 101, 621-625 (2007).
13. M. Zang, W. Liu, G. Li, Isolation and characterization of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mustus macropterus*), *Food Chemistry* 115, 826-831 (2009).
14. R. Duan, J. Zhang, X. Du, X. Yao, K. Konno, Properties of collagen from skin scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*), *Food Chemistry* 112, 702-706 (2009).



CHARACTERIZATION AND BIOACTIVITIES OF COLLAGEN HYDROLYSATES FROM NILE TILAPIA AND FARMED GIANT CATFISH SKINS

Anintita Siromakun¹, Pannika Tongkorsom¹, Phattarathorn Panitworakul¹, Sureeporn Pommata¹, Saroat Rawdkuen², Natthawut Thitipramote^{1*}

¹School of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand

²Food Technology Program, School of Agro-Industry, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand

*Corresponding author: E-mail: natthawut.thi@mfu.ac.th; Tel.: +66 (0) 5391-6837; Fax: +66 (0)5391-6831

ABSTRACT

Nile tilapia (NT: *Oreochromis niloticus*) and farmed giant catfish (GC: *Pangasianodon gigas*) have become an economically important cultured freshwater fish in Thailand, especially in Chiang Rai province. Skins of these fishes were used as the starting material for collagen extraction by using acid solubilization process. The yields of collagen from NT and GC skin were 26.5% and 5.96%, respectively (wet weight basis). Electrophoretic patterns of these collagens showed high band intensity for the major compositions, especially α - and β -components as the type I collagen. Collagen hydrolysates (CH) were hydrolyzed by using 4 proteases (bromelain, papain, trypsin, and protease from *Calotropis procera* latex) (ratio of collagen to enzyme, 1:1000 g/unit) at 37°C for 0.5, 1, 2 and 3 hours. The hydrolysates obtained by using these enzymes showed the disappearance of the three major protein bands of collagen. DPPH radical-scavenging activity of NT and GC collagen hydrolysates was significantly difference among the hydrolysis conditions ($p < 0.05$). It was significant highest on bromelain-treated CH at 2 hours for NT collagen (12.38 mg TEAC g/dry weight) whereas for GC collagen occurred with protease from *Calotropis procera* latex-treated CH at 1 hour (7.46 mg TEAC g/ dry weight). The results suggested that the NT and GC fish skins could be used as an alternative source for collagen extraction and it is possible for obtaining bioactive peptides from these collagens hydrolyzed with the proteolytic enzymes. These finding may useful for further investigate to optimize the hydrolysis conditions for production of antioxidant compounds and using as functional ingredients in cosmetics, foods and dietary supplements.

Keywords: Bioactivity, Collagen, Protein hydrolysates, Giant catfish, Nile tilapia

INTRODUCTION

Collagen is the most abundant structural protein (~30% of total animal protein) found ubiquitously in body including skin¹ that is a very important natural material in medicine, cosmetic and also in food industry. Functional and nutritional properties of proteins including collagen can be improved and upgraded by enzymatic hydrolysis^{2,3}. Proteases from different sources are commonly used to obtain a more selective hydrolysis since they are specific for peptide bonds adjacent to certain amino acid residues such as commercial enzymes (e.g. Alcalase and Flavourzyme) and specific enzymes (e.g. bromelain, papain and trypsin)^{3,4,5}. The characteristics of the hydrolysates obtained directly affect the functional properties. Thus, the process for generating the hydrolysates from any material requires optimizing conditions to obtain high functional activity^{4,6,7}. Moreover, antioxidant activity has recently been reported in peptides from enzymatic hydrolysates of food proteins such as fish skin

gelatins^{3,5}, squid gelatin⁶, and jellyfish collagen⁷. Their antioxidant properties are also depended on the hydrolysis condition especially the type of enzymes used^{5,8,9}. Generally, collagens and collagen hydrolysates used in commercial products are mainly obtained from cattle and swine. However, the use of mammalian collagen has limited by the spread the animal disease to human such as the mad-cow disease and the foot/mouth disease. Thus, the finding of new materials for collagen extraction has been investigated, especially in fishery industries. About 30% of the wastes consist of skin and bone, which are very rich in collagen¹⁰. Recently, the collagen extraction from the skin, fin and bone of marine fish has been broadly studied^{11,12,13}, but not in case of the freshwater fish. In Thailand, the freshwater fish that are widely cultured for trade has little been investigated for collagen extraction. The Nile tilapia is the one of importantly farmed economic fish (value ~7.8 billion baht in year 2007) in the north of Thailand, especially in Chaing Rai province (~38,538 ton in same year). In addition, farmed giant catfish has become an economically important¹⁴. Beside freshwater fish processing, by-products are generated according to the fish was consumed. Moreover, they may causes of environmental pollution if they have no further process to eliminate them. Therefore, the objectives of this study were to investigate the characteristics of acid-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia and farmed giant catfish and to optimize the condition for collagen hydrolysates production by using various enzymes (bromelain, papain, trypsin, and protease from *Calotropic procera* latex) and also their bioactivity characteristics were investigated. Utilization of freshwater fish industry by-products as a material for value-added product preparation would be useful.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Acetic acid and sodium hydroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals for electrophoresis were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Nile tilapia and farmed giant catfish were obtained from Charan Farm in Chiang Rai, Thailand. Commercial collagen from bovine achilles tendon (C9879-5G) was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the enzymes (bromelain, papain, and trypsin) were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA).

Methods

1. Fish skin preparation

Frozen skins of Nile tilapia and farmed giant catfish were thawed and washed with running tap water. The residual meat in fish skin was removed manually and cleaned samples were washed with tap water and drained. The skin was then cut into small pieces (0.5x0.5 cm) and placed in a polyethylene bag. The prepared skin was stored at -20°C until used.

2. Collagen extraction

The collagens were extracted following the method of Kittiphattanabawon et al. (2005)¹² with a slight modification. All preparation procedures were performed at 4°C.

2.1 Preparation of skin for collagen extraction

To remove non-collagenous proteins, the skin was mixed with 0.1 N NaOH at a sample/alkaline solution ratio of 1:10 (w/v). The mixture was stirred for 6 h with changing of the alkaline solution every 2 h. Then, the alkali-treated skins were washed with cold water until neutral pH of wash water was obtained. The treated skins were then defatted with 10% butyl alcohol with a solid/solvent ratio of 1:10 (w/v) for 18 h. Defatted skins were washed with 10 volumes of cold water for three times.

2.2 Acid-solubilization process

Pretreated skin was soaked in 0.5 M acetic acid with a solid to solvent ratio of 1:15 (w/v) for 48 h with continuous stirring. The mixtures were filtered with two layers of cheesecloth. The collagen in the filtrate was precipitated by adding NaCl to a final concentration of 2.6 M in the presence of 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5. The resultant precipitate was collected by centrifugation at 20,000g at 4°C for 60 min. The pellet was dissolved in a minimum volume of 0.5 M acetic acid, dialyzed against 25 volumes of 0.1 M acetic acid for 12 h. Thereafter, it was dialyzed against 25 volumes of distilled water for 48 h. The resulting dialysate was freeze dried and referred to as “acid soluble collagen; ASC”.

3. Characterization of acid-soluble collagens

3.1 Proximate analysis

Fish skins and extracted collagen were subjected to proximate analyses, including moisture, ash, fat and protein contents, according to the AOAC (2000) method Nos. 950.46, 928.08, 960.39 and 920.153, respectively.

3.2 Yield

The yield of collagen (Y_c) was calculated by:

$$Y_c = \frac{(V_c \times C_c)}{W_t}$$

; where V_c is the volume of extracted collagen solution in milliliter, C_c is the protein concentration of the same solution (g/mL), and W_t is the weight of the fish skin in gram. Each set of the test was done in duplicate.

3.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed by the method of Laemmli (1970)¹⁶. The collagens were dissolved in 0.02 M sodium phosphate containing 1% SDS and 3.5 M urea (pH 7.2) with continuous stirring at room temperature. The mixtures were centrifuged at 8,500g for 5 min to remove un-dissolved debris. Solubilized samples were mixed at 1:1 (v/v) ratio with the sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 4% SDS, 20% glycerol) in the presence (reducing) or absence (non-reducing) of 10% β -ME. Samples were loaded onto the polyacrylamide gel (7.5% gel) and subjected to electrophoresis at a constant current of 20 mA/gel by using a Mini Protean Tetra Cell unit. After electrophoresis, gels were stained with 0.05% (w/v) Coomassie blue R-250 in 15% (v/v) methanol and 5% (v/v) acetic acid and destained with 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid. Molecular weight markers were used to estimate the molecular weight of proteins. Commercial collagens were used as a reference.

4. Collagen hydrolysates

4.1 Determination of enzyme activity

The enzyme activity was determined by caseinolytic activity assay¹⁷. One of caseinolytic activity unit is defined as the amount of enzyme needed to produce an increment of 0.01 absorbance unit per minute at the assayed condition.

4.2 Preparation of collagen hydrolysates(CH)

The preparation of CH was modified from Yang *et al.* (2008)⁵. Four proteases were used: bromelain (from pineapple stem; enzyme activity (EA) = 44.68 units/mg solid), papain (from papaya latex; EA= 143.1 units/mg solid), trypsin (from bovine pancreas; EA= 63.7 units/mg solid) and protease from *Calotropis procera* latex (EA= 326 units/mg solid). The

freeze-dried NT and GC collagens (0.25 g) were dissolved in 50 ml of 0.1 M sodium phosphate pH 7.0. Collagen solution was added to one of each enzyme (hydrolysates: enzyme = 1:1000 g/unit). The hydrolysis was performed at 37°C for 0, 1, 2, or 3 hour in a 100 rpm shaking water-bath incubator. The enzymatic hydrolysis was ended by cooling the mixtures at 4°C for 10 min to inactivate the enzyme activity. The solution containing hydrolysates was centrifuged at 1,000 rpm for 5 min at 4°C. The supernatants were used for bioactivities characterization.

4.3. Molecular weight distribution by SDS-PAGE

Protein patterns of CH were determined using SDS-PAGE¹⁶ following above collagen patterns process (Topic 3.3).

5. DPPH radical scavenging activity

DPPH radical scavenging activity of CH was determined as described by Khantaphant and Benjakul (2008)³ with a slight modification. Sample solution (1.5 mL) was added with 1.5 mL of 0.1 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) in 95% ethanol. The mixture was mixed vigorously and allowed to stand for 30 min in dark at room temperature. The absorbance of resulting solution was measured at 517 nm. The activity was expressed as μmol trolox equivalents (TE) /mg protein.

6. Data analysis

The obtained data were statistically analyzed using the SPSS program for window (SPSS version 11.5, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and the differences were considered significant when $p < 0.05$. The comparison of the yield and proximate analysis data between the NT and GC collagens were analyzed by using independent *t*-test. The difference of the DPPH scavenging effects between the bromelain-, papain-, trypsin-, and *Calotropic procera* protease-CH were analyzed by using Analysis of Variance (ANOVA).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Proximate compositions and collagen recovery

The proximate compositions and extraction yield of collagen from NT and GC skins are shown in Table 1. The yield of collagen from NT skin (28.5%) was significantly higher than that of GC skin (8.5%) (wet basis). The yield of NT collagen was higher than the ASC from other fish skins e.g. bigeye snapper (10.94%)¹², brownbanded bamboo shark (9.38%)¹⁸ and brownstripe red snapper (9%)¹¹. The collagen obtained from GC skin contained no significant amount to the others. The difference of the extraction yield of collagen from both fish skins probably due to the different structure of skins used.

Table 1 Chemical composition and yield of collagen and fish skin from NT and GC

Compositions (%)	Collagen		Fish skin	
	Nile tilapia	Giant catfish	Nile tilapia	Giant catfish
Yield	28.50±2.35 ^a	8.48±0.18 ^b	-	-
Protein	94.55±0.27 ^a	86.28±0.4 ^b	26.55±1.26 ^a	34.03±0.54 ^b
Moisture	3.30±0.71	4.83±2.68	69.68±0.40 ^a	64.86±0.40 ^b
Lipid	3.42±0.65 ^a	0.12±0.04 ^b	4.40±0.86	2.69±1.65
Ash	0.16±0.02	0.08±0.01	0.20±0.00	0.25±0.01

Values (Mean ± S.E.) within a row followed by a different superscript differ statistically (independent *t*-test, $p < 0.05$).

2. Molecular weight distribution of collagens

The protein patterns of fish skin collagens under reducing and non-reducing conditions are presented in Figure 1. Three major bands were found in all samples, representing β -, α_1 , α_2 . The results indicated that type I collagen is a major component in collagen extracted from NT and GC fish skin. Characteristic for type I collagen β -, α_1 , α_2 components were also observed in skin collagen of Nile perch¹, yellowfin tuna¹³ and brownstripe red snapper¹¹, and skin and bone collagens of bigeye snapper¹². Comparing between collagens under reducing and non-reducing conditions, the patterns of the samples were similar; indicating the absence of disulfide bonds in those collagens, although the intensity of these bands is slightly different. The results were in accordance with the previously reported from skin collagen of several other fish species e.g. Nile perch¹, bigeye snapper¹² and brownstripe red snapper¹¹.

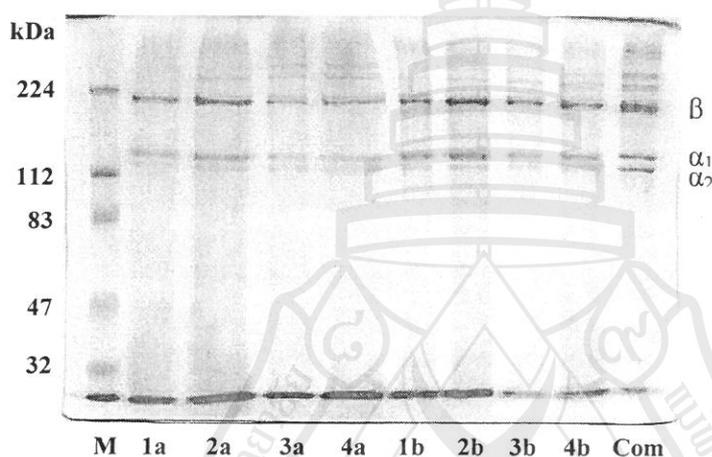


Figure 1. SDS-PAGE patterns of collagens from Nile tilapia skin (1-2) and farmed giant catfish skin (3-4) under reducing (a) and non-reducing (b) conditions. M: molecular weight markers; Com: commercial collagen.

3. Collagen hydrolysates

NT and GC collagen hydrolysates were prepared by using four enzymes (bromelain, papain, trypsin, and protease from *Calotropis procera* latex) at different hydrolysis time (0.5, 1, 2, and 3 hours) for 37 °C. SDS-PAGE showed all of four enzymes-treated CH of both NT and GC samples in various hydrolysis times were similar protein pattern. These protein patterns did not have the three major bands of type I collagen (Figs. 2,3). It suggests that these four proteases in this study condition (37 °C) can hydrolyze collagen to be the smaller molecule. However, the intensity and the location of protein bands were different in each enzyme-treated CH that the trypsin-treated (T) and *Calotropis procera* latex-treated CH of NT from all hydrolysates times were higher intensity band than other treated of same sample (Fig. 2). GC sample showed the higher intensity band on *Calotropis procera* latex-treated CH on the apical region as higher molecular weight (Fig. 3). This finding may be useful for further investigate to optimize the hydrolysis condition of collagen hydrolysates.

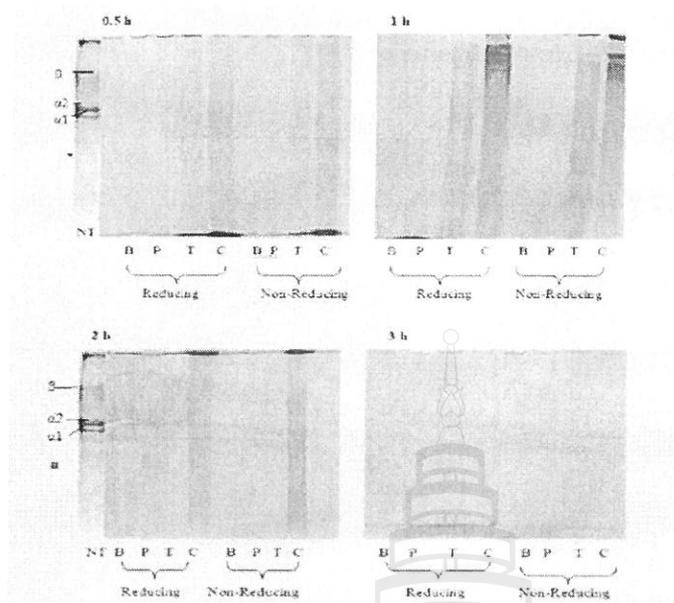


Figure 2. SDS-PAGE pattern of Nile tilapia (NT) collagen hydrolysates with bromelain (B), papain (P), trypsin (T) and protease from *Calotropis procera* latex (C) at the different hydrolysis times (0.5, 1, 2, and 3 hours).

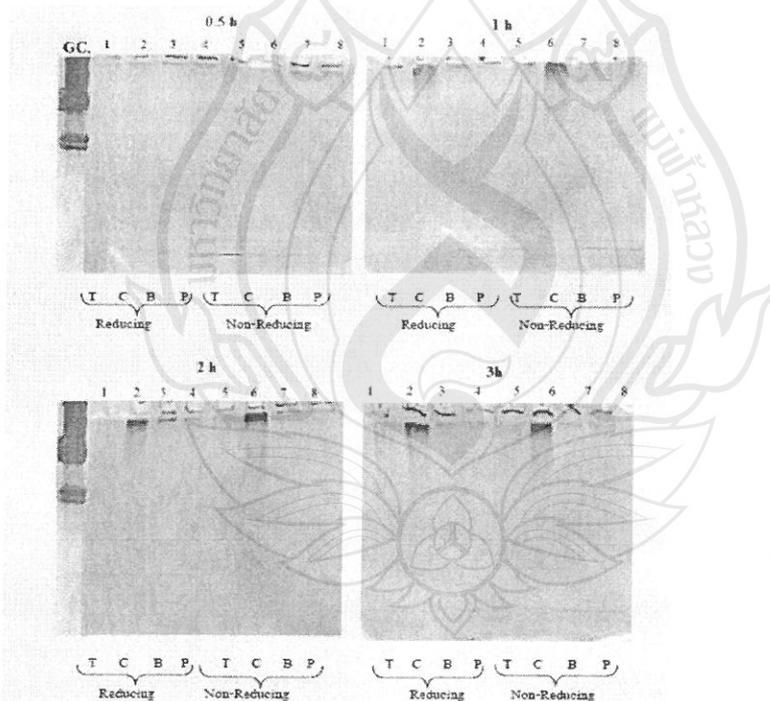


Figure 3. SDS-PAGE pattern of giant catfish (GC) collagen hydrolysates with bromelain (B), papain (P), trypsin (T) and protease from *Calotropis procera* latex (C) at the different hydrolysis times (0.5, 1, 2, and 3 hours).

4. Antioxidant activity of collagen hydrolysates

DPPH radical scavenging activity of NT and GC skin collagen hydrolysates (CH) using various enzymes (bromelain, papain, trypsin, and protease from *Calotropis procera* latex) and different times (0.5, 1, 2 and 3 hours) were investigated (Table 2). The NT and GC results showed that DPPH activity was significantly different between each enzyme and the hydrolysis times ($p < 0.05$). It was significant highest on bromelain-treated CH at 2 hours for NT collagen (12.38 mg TEAC g/dry weight) whereas for GC collagen occurred with protease from *Calotropis procera* latex-treated CH at 1 hour (7.46 mg TEAC g/ dry weight). Moreover, the antioxidant activity of GC collagen hydrolysates from each enzyme has the same tendency that showed the highest activity during 1 hour of hydrolysis time. The results suggest that the optimal hydrolysis conditions for collagen hydrolysates with high antioxidant activity were 37 °C at 2-3 hours for NT collagen and 1 hour for GC collagen with these four proteases.

Table 2. DPPH radical scavenging of NT and GC collagen hydrolysates by using different proteolytic enzymes at each hydrolysis times.

Time (h)	Enzymes	DPPH (mg TEAC/g.dw)	
		Nile tilapia	Giant catfish
0.5	B	9.57 ± 0.90 ^a	4.36±0.40 ^{ab}
	P	7.22 ±0.97 ^b	2.39±0.17 ^b
	T	3.77 ±0.68 ^c	5.18±0.26 ^a
	C	8.78 ±0.23 ^{ab}	4.80±0.96 ^a
1	B	8.42 ±0.34 ^a	6.31±0.18
	P	7.52 ±0.26 ^b	7.16±0.37
	T	5.33 ±0.16 ^c	5.45±0.68
	C	4.85 ±1.60 ^c	7.46±1.02
2	B	12.38 ±1.28 ^a	2.92±0.99 ^b
	P	8.51 ±0.80 ^b	6.95±0.21 ^a
	T	8.50 ±0.59 ^b	2.33±0.13 ^b
	C	4.80 ±0.06 ^c	3.08±0.53 ^b
3	B	6.69 ±0.30 ^b	5.10±0.99
	P	9.11 ±0.05 ^a	4.93±0.16
	T	5.61 ±0.15 ^{bc}	3.88±0.10
	C	4.79 ±1.05 ^c	4.99±0.98

Mean±S.D. (n=3); Values within a column in a same time followed by a different superscript differ statistically (ANOVA, $p < 0.05$); B=Bromelain, P=Papain, T=Trypsin, C= protease from *Calotropis procera* latex.

CONCLUSION

Collagen could be successfully extracted from the skin of Nile tilapia and farmed giant catfish by acid solubilization with the yield of 28.5% and 8.5%, respectively. The collagens were characterized as type I without disulfide bond. Nile tilapia and giant catfish collagens hydrolyzed with bromelain, papain, trypsin, and protease from *Calotropis procera* latex may be possible way to obtain bioactive peptides that exhibited the high DPPH free-radical scavenging. Based on the results, NT and GC skin can be used as an alternative source of collagen, besides mammals. The hydrolysates preparation results may be useful for optimization the hydrolysis conditions for production of antioxidant or functional ingredients in cosmetics, food, and dietary supplements.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was in part funded by a grant from the Mae Fah Luang University. The authors also would like to thank Charun Farm for providing the fish used in this experiment.

REFERENCES

1. Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., and Duodu, K.G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry* **85**, 81-89.
2. Liu, B.L. and Chiang, P.S. (2008). Production of hydrolysate with antioxidant activity and functional properties by enzymatic hydrolysis of defatted sesame (*Seasmun indicum* L.). *International Journal of Applied Science and Engineering* **2**, 73-83.
3. Khantaphant, S. and Benjakul, S. (2008). Comparative study on the protease from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidant activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **151**, 410-419.
4. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. (2007). Antioxidant activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry* **102**, 1317-1327.
5. Yang, J.I., Ho, H.Y., Chu, Y.J. and Chow, C.J. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry* **110**, 128-136.
6. Gimenez, B., Aleman, A., Montero, P. and Gomez-Gullen, M.C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry* **114**, 967-983.
7. Zhuang, Y.L., Zhao, X. and Li, B.F. (2009). Optimization of antioxidant activity by response surface methodology in hydrolysates of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) umbrella collagen. *Journal of Zhejiang University Science B* **10**, 572-579.
8. Dryakova, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Curda, L. and Korhonen, H.J.T. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology* **230**, 865-874.
9. Mendis, E., Rajapakse, N. and Kim, S.K. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 581-587.
10. Gomez-Guillen, M.C., Turnay, J., Fernandez-Diaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A., and Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids* **16**, 25-34.
11. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., and Tanaka, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry* **93**, 475-484.
12. 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.
13. Woo, J.W., Yu, S.J., Cho, S.M., Lee, Y.B., and Kim, S.B. (2008). Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocolloids* **22**, 879-887.
14. Department of Fisheries of Thailand. (2010). Fisheries statistics of Thailand. Bangkok: Department of Fisheries of Thailand. Available from: <http://www.fisheries.go.th/it-stat/>. Accessed April 27, 2010.

15. AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
16. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
17. Chaiwut, P., Rawdkuen, S. and Benjakul, S. (2010). Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethyleneglycol-salts biphasic system. *Process Biochemistry* **45**, 1148-1155.
18. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., and Shahidi, F. (2010). Isolation and characterization of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry* **119**, 1519-1529.



Characterization and bioactivities of collagen hydrolysates from striped catfish and farmed giant catfish skins

Natthawut Thitipramote^{a,b}, Keerati Krongsuksirichai^b, Phanuphong Chaiwut^{a,b}, Punyawatt Pintathong^{a,b}, Saroat Rawdkuen^c

^a Excellent Center of Cosmetic and Wellness, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand.

^b School of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand.

^c Food Technology Program, School of Agro-Industry, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand.

Abstract

Collagen was extracted from skins of striped catfish (SC: *Pangasianodon hypophthalmus*) and farmed giant catfish (GC: *Pangasianodon gigas*) using acid-solubilization process at 4 °C for 48 hours. The yields of collagen from SC and GC skins were 27.3% and 5.96%, respectively (wet weight basis). Protein pattern of these collagens showed the three major bands (β , α_1 , α_2 components) as the type I collagen. SC and GC collagens were hydrolyzed by using four proteases (bromelain, papain, trypsin, and protease from *Calotropis procera* latex) with ratio collagen: enzymes, 1:1000 g/units at 37 °C for 0.5, 1, 2, and 3 hours. The SC and GC collagen hydrolysates (CH) obtained by using all enzymes showed the absence of the three major protein bands of collagen in SDS-PAGE. DPPH radical-scavenging activity of SC and GC collagen hydrolysates was significantly different among the hydrolysis condition ($p < 0.05$). It was significant highest on *Calotropis procera* latex-treated CH at 1 hour for GC collagen (7.46 mg TEAC g/dry weight) and at 2 hours for SC collagen (2.44 mg TEAC g/dry weight). The results suggest that the SC and GC fish skins could be used as an alternative source for collagen extraction and the bioactive peptides can be obtained from these catfish collagens hydrolyzed with the proteolytic enzymes.

Keywords: Acid-soluble collagen, DPPH, Giant catfish, Protein hydrolysates, Striped catfish

Introduction and Objective

Collagen is widely and diversely used as natural material in food, medicine and cosmetic industries. Its functional and nutritional properties (e.g. antioxidant activity) can be improved and upgraded by enzymatic hydrolysis (e.g. protease, bromelain, papain, trypsin) with optimizing condition¹. Collagen and collagen hydrolysate (CH) are mainly obtained from cattle and swine, however; it has limited by the spread the animal disease to human. Thus, the finding of new materials for collagen extraction has been investigated, especially from wastes of fishery industries. The collagen extraction from the skin, fin and bone of marine fish has been broadly studied^{2,3}, but not in case of the freshwater fish. In Thailand, the freshwater fish that are widely commercially cultured has little been studied for collagen extraction, especially in thick skin species. The striped catfish (SC) and the farmed giant catfish (GC) has become importantly economic fish mostly cultured in Chiang Rai province, Thailand. The objectives of this study were to investigate the characteristics of the collagen from SC and GC skin and to optimize the condition for collagen

hydrolysates production by using various enzymes and also their bioactivity characteristics were investigate.

Materials and Methods

SC and GC skins was removed manually, cleaned and cut into small pieces (0.5x0.5cm) as well as stored at -20°C until used. Commercial collagen from bovine achilles tendon was used as the standard collagen.

1. Collagen extraction

The SC and GC collagens were extracted following the method of Kittiphattanabawon et al (2005)³ with a slight modification. The non-collagenous proteins were removed by 0.1 N NaOH (sample/alkaline; 1:10 w/v). Collagen was extracted with 0.5 M acetic acid (1:20 w/v) at 4°C for 48 hours. Collagen yield (recovery) was determined in wet basic.

2. SDS-PAGE

Protein pattern of fish skin, collagen, and collagen hydrolysate (CH) was performed by the method of Laemmli (1970)⁴ with 4% stacking and 7.5% running gels.

3. Collagen hydrolysate (CH)

The preparation of CH was modified from the method described by Yang et al., (2008)⁵.

The freeze-dried SC and GC collagens (0.25g) were dissolved in 50 ml of 0.1M sodium phosphate buffer pH 7 and hydrolyzed by each bromelain (B), papain (P), trypsin (T), and protease from *Calotropis procera* latex (C) in ratio 1:100 g/unit (hydrolysates: enzyme) at 37 °C for 0 to 3 hours. DPPH-radical scavenging activity of each CH were determined as describe by Khantaphant and Benjakul (2008)¹.

4. Data analysis

The obtained data were statistically analysed using the SPSS program version 11.5 for window. Differences between treatments were compared by Tukey HSD test of ANOVA.

Results and Discussion

The yield of skin collagen from SC (27.3%) was higher than GC (5.96%) (wet basis) that was higher than previous studies e.g. bigeye snapper (10.94%)³ and brownstripe red snapper (9%)². The different yield of collagen is probably due to the different structure of fish skin used.

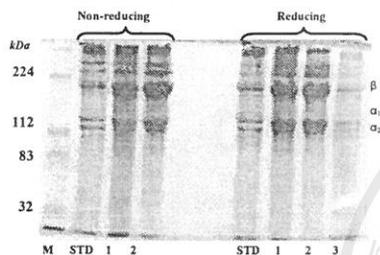


Figure 1. SDS-PAGE patterns of collagens from GC (1) and SC (2) and the SC fish skin (3). M=molecular weight marker. STD= commercial collagen.

The protein patterns (Fig. 1) of SC and GC collagens under reducing and non-reducing were similar that three major bands were found in all samples, representing β -, α_1 , α_2 as type I collagen. The similarity of protein patterns in reducing and non-reducing conditions indicated that these collagens were absent of disulfide bonds. Characteristic of type I collagen was also obtained in other skin collagens^{2,3}. Moreover, the CH of SC and GC obtained by using four proteolytic enzymes showed the absence of the three major protein bands in SDS-PAGE (data not shown). The results indicated that these proteases can hydrolyze collagen into the smaller peptides or single molecule.

DPPH radical-scavenging activity of collagen hydrolysates from SC and GC was significantly different among the hydrolysis

condition ($p < 0.05$). It showed the highest activity on *Calotropis procera* latex-treated CH prepared with 1 hour for GC collagen (7.46 mg TEAC/g dry weight) and 2 hours for SC collagen (2.44 mg TEAC/g wt) (Table 1).

Table 1. DPPH radical scavenging of SC and GC collagen hydrolysates by using different protease at each hydrolysis times.

Time (h)	Enzymes	DPPH (mg TEAC/ g. dw)	
		Striped catfish	Giant catfish
0.5	B	1.15±0.20 ^b	4.36±0.40 ^{ab}
	P	1.41±0.25 ^b	2.39±0.17 ^b
	T	1.60±0.36 ^{ab}	5.18±0.26 ^a
	C	1.98±0.85 ^a	4.80±0.96 ^a
1	B	1.55±0.03 ^b	6.31±0.18
	P	1.77±0.04 ^b	7.16±0.37
	T	1.57±0.08 ^b	5.45±0.68
	C	2.06±0.05 ^a	7.46±1.02
2	B	1.54±0.08 ^b	2.92±0.99 ^b
	P	1.56±0.02 ^b	6.95±0.21 ^a
	T	1.59±0.39 ^b	2.33±0.13 ^b
	C	2.44±0.48 ^a	3.08±0.53 ^b
3	B	1.59±0.05 ^c	5.10±0.99
	P	1.90±0.05 ^c	4.93±0.16
	T	1.63±0.03 ^b	3.88±0.10
	C	2.33±0.07 ^a	4.99±0.98

Mean±S.D. (n=3); Values within a column in a same time followed by a different superscript differ statistically (ANOVA, $p < 0.05$).

References

1. Khantaphant S, Benjakul S. Comparative study on the protease from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 2008; 151: 410-419.
2. Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chem.* 2005; 93: 475-484.
3. Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* 2005; 89: 363-372.
4. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
5. Yang JI, Ho HY, Chu YJ, Chow CJ. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry.* 2008; 110: 128-136.

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ (ภาษาไทย) ดร.ณัฐราวุฒิ จิตติปราโมทย์
 (ภาษาอังกฤษ) Dr. Natthawut Thitipramote
 ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ
 สถานที่ทำงาน สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
 333 หมู่ 1 ตำบลท่าสุด อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย รหัสไปรษณีย์
 57100
 โทรศัพท์ 053-916837, 084-9978418 โทรสาร 053-916831
 e-mail nthitipramote@hotmail.com, natthawut.thi@mfu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา สถาบัน มหาวิทยาลัยศิลปากร
 ปีที่สำเร็จ 2545

ปริญญาเอก สาขาวิชา ชีววิทยา สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
 ปีที่สำเร็จ 2553

รางวัลที่เคยได้รับ

The outstanding poster presentation in the RGJ-Ph.D. Congress IX, Jomtien Palm Beach Resort, Pattaya, Chonburi, April 4-6, 2008.

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

1. วิทยาเนื้อเยื่อและสรีรวิทยาสัตว์
2. สกัดสารออกฤทธิ์จากสัตว์และพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง
3. การศึกษาสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ

ผศ.ดร.สาโรจน์ รอดคื่น

Asist. Prof. Dr. Saroat Rawdkuen

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำ

สถานที่ทำงาน

สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

333 หมู่ 1 อ.เมือง จ.เชียงราย 57100

โทรศัพท์

053-916752

โทรสาร

053-916739

Email

saroat@mfu.ac.th, sa_roat@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

- Ph.D 2001-2005 Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.
Major: Food Technology (emphasis in Food Chemistry and Biochemistry)
- B.Sc 1995-1999 Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.
Major: Agro-Industry (First Class Hons.) (emphasis in Food Science and Technology)

