



โครงการวิจัยที่ 2 การสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากเศษเหลือของการแปรรูปปลาแชลมอน

หัวหน้าโครงการ : จีรภา หินชูย

ผู้ร่วมงานวิจัย : นวพร วรรณวิศาล



การสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากเศษเหลือของการแปรรูปปลาแชลมอน

จิรภา หินชุย และนภาพร วรรณวิศาล

คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีโรงงานแปรรูปปลาแชลมอนหลายโรงงาน แต่ละโรงงานมีเศษเหลือเกิดขึ้นจำนวนมาก ซึ่งสามารถนำเศษเหลือของปลาแชลมอน ได้แก่ หนัง และกระดูก มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตคอลลาเจน และเจลาติน เพื่อเป็นการกำจัดเศษเหลืออย่างมีประสิทธิภาพ และเพิ่มมูลค่าให้เศษเหลือเหล่านี้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดคอลลาเจน และเจลาตินจากหนังปลาแชลมอนให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการนำไปใช้ประโยชน์ โดยมีการเตรียมหนังปลาแชลมอนให้เหมาะสมกับการนำไปสกัดคอลลาเจนและเจลาติน สภาวะในการเตรียมวัตถุดิบ คือ แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.8 M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจน คือ การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินร้อยละ 0.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คอลลาเจนที่ได้มีผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 3.5 ของน้ำหนักหนังปลาสด และพบแถบโปรตีน 3 แถบของคอลลาเจนชนิด β , α_1 , และ α_2 คอลลาเจนที่ได้มีคุณสมบัติเป็นคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่พบในผิวหนังมนุษย์ จึงเหมาะที่จะนำมาสมานแผลที่ผิวหนัง

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังปลาแชลมอน คือ ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นโดยใช้อุณหภูมิ 55 °C โดยได้ผลผลิตเจลาตินร้อยละ 6.35 มีคุณสมบัติด้านความหนืด 37.01 cp และความแข็งแรงของเจล 12.77 กรัม ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นฟิล์มเจลาตินหรือแคปซูลทางการบรรจุในลำดับต่อไป

คำสำคัญ: หนังปลา คอลลาเจนจากปลา เจลาตินจากปลา



Extraction of collagen and gelatin from Salmon processing waste

Jirapa Hinsui and Nawaporn Wannawisan

Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok

Abstract

There are many salmon processing plants in Thailand. They generate a lot of waste, skin and bone, can be materials for collagen and gelatin production. Salmon processing waste utilization is the way for waste management and adding value for these waste. The objective in this research is to study in extraction of collagen and gelatin from salmon processing waste for cosmetic industry, product coating and other food industrial proposes. Skin was cleaned to ready for collagen and gelatin extraction. Condition for material preparation was soaking salmon skin in 0.8 M NaOH for 3 hr.

Condition for collagen extraction was extracted collagen from salmon by 1.0 M acetic acid and 0.2% pepsin for 48 hr. Collagen yield was 3.5% of fresh salmon skin. There were 3 protein bands of β , α_1 , and α_2 . Collagen that showed this collagen was collagen type I, was similar to human skin collagen, so this collagen was suitable to applying for wound healing.

Condition for gelatin extractin was hot water 55 for 2 hr. Gelatin yield was 6.35%. Viscosity and gel strength of this gelatin were 37 cp and 12.77 g, respectively. This gelatin was suitable for development of gelatin film or capsule for packaging material.

Keywords: fish skin, fish collagen, fish gelatin

บทนำ

การพัฒนาอุตสาหกรรมอาหาร ก่อให้เกิดเศษเหลือขึ้นมากมาย ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุ เช่นเดียวกันอุตสาหกรรมการแปรรูปปลาจะมีเศษเหลือ เช่น หนัง เกล็ด ก้าง เป็นต้น ส่วนใหญ่แล้วจะนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งมีมูลค่าไม่มากนัก ปัจจุบันเศษเหลือเหล่านี้ถูกนำมาพัฒนาคุณภาพให้เหมาะสมต่อการใช้เป็นอาหารมนุษย์ อาหารสัตว์ที่มีคุณภาพดีขึ้น ตลอดจนนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม ได้แก่ เครื่องหนัง ปลาปน ปลาหมัก กาว บัญ โปรตีนปลาเข้มข้น แคลเซียม และเจลาติน (ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์, 2551)

จึงมีการนำคอลลาเจนมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารใช้ในทางการแพทย์และทางเภสัชกรรม เช่น ผลิตเป็นผิวหนังเทียมเพื่อรักษาแผลสดบริเวณผิวหนัง (Takai *et al.*, 1997) เป็นสารช่วยสมานบาดแผล ใช้เป็นแคปซูลยา ใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิวและในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง (Swan and Torley, 1991) ในอุตสาหกรรมการผลิตคอลลาเจนวัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่ คือ หนังวัวและหนังสุกร (Nagai *et al.*, 2002) จึงมีการหาแหล่งวัตถุดิบต่าง ๆ อีกมากมายที่สามารถนำมาผลิตคอลลาเจนได้ โดยเฉพาะสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นแหล่งของคอลลาเจนที่น่าสนใจ

ขณะเดียวกันเจลาตินที่ผลิตได้มาใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกัน โดยนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของอาหาร เป็นสารให้ความคงตัว ช่วยป้องกันการเกิดผลึกของน้ำแข็ง และน้ำตาลในระหว่างการเก็บรักษา ในอุตสาหกรรมการผลิตยา ใช้เจลาตินทำเป็นแคปซูลบรรจุยาที่มีลักษณะเป็นผง เพื่อป้องกันการแตกหักของเม็ดยา และเป็นประโยชน์ต่อการปลดปล่อยยา โดยการพองตัว และแตกออกได้ของแคปซูล นอกจากนี้ยังใช้ในการทำอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Ockerman, 1988)

ในการแปรรูปปลาแชลมอนจะทำให้เกิดเศษเหลือเกิดขึ้นจำนวนมาก จึงควรมีการศึกษาการนำเศษเหลือของปลาแชลมอน ได้แก่ หนัง และกระดูก มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตคอลลาเจน และเจลาติน เพื่อเป็นการกำจัดเศษเหลืออย่างมีประสิทธิภาพ และเพิ่มมูลค่าให้เศษเหลือเหล่านี้



วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากเศษเหลือของการแปรรูปปลาแซลมอน

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

หนังปลาแซลมอน Atlantic salmon (*Salmo salar*) จากบริษัท ไทยยูเนี่ยนฟิรเช่น จำกัด บรรจุในลังโฟมที่มีน้ำแข็ง เพื่อรักษาความเย็นตลอดการเดินทาง ส่งมายังห้องปฏิบัติการภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บรรจุหนังปลาในถุงพลาสติก ถุงละ 1 กิโลกรัม เก็บรักษาหนังปลาที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทดลอง

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 การเตรียมตัวอย่างเบื้องต้น

การเตรียมตัวอย่างหนังปลาเพื่อใช้ในการสกัดคอลลาเจนและเจลาติน นำหนังปลามากำจัดเนื้อที่ติดอยู่ที่หนังและล้างด้วยน้ำเย็น ทำความสะอาดหนังปลาและนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ($1.0 \times 1.0 \text{ cm}^2$)

1.2 การเตรียมตัวอย่างด้วยสารเคมี

การเตรียมตัวอย่างด้วยสารเคมี เป็นการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน เช่น เนื้อ เลือด เมือกของปลา โดยการนำหนังปลาที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างเบื้องต้นมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1.0 M ในอัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลาย เท่ากับ 1: 20 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เขย่าตลอดเวลาที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำเย็นจน pH ของน้ำล้างเป็นกลาง (pH ประมาณ 7) เก็บตัวอย่างของหนังปลาที่ผ่านการเตรียมด้วยสารเคมี ไปตรวจสอบน้ำหนัก การพองตัว และความใส

2. ศึกษาสภาวะในการผลิตคอลลาเจนจากหนังปลาแซลมอน

2.1 การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก

การศึกษหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดอะซิติก โดยการใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 M ในอัตราส่วนของหนังปลาต่อสารละลาย

1: 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เขย่าตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

2.2 การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกร่วมกับเอนไซม์เปปซิน

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดอะซิติก ร่วมกับเอนไซม์เปปซิน โดยการนำหนังปลาใส่ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นที่ดีที่สุดจากข้อ 2.1 ในอัตราส่วนของหนังปลาต่อสารละลาย 1: 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นเติมเอนไซม์เปปซินลงในสารละลายที่มีตัวอย่างหนังปลาที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เขย่าตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

2.3 การตรวจสอบคุณสมบัติของคอลลาเจน

การตรวจสอบคุณสมบัติของคอลลาเจนที่สกัดได้ ดังนี้

2.3.1 น้ำหนักโมเลกุลและชนิดของคอลลาเจนที่สกัดได้

2.3.2 ความสามารถในการละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์

2.3.3 ความสามารถในการละลายในสภาวะที่มี pH ต่างกัน

3. ศึกษาสภาวะในการผลิตเจลาตินจากหนังปลาแชลมอน

3.1 การสกัดเจลาตินด้วยน้ำร้อน

ศึกษาสภาวะในการผลิตเจลาตินจากหนังปลาแชลมอน โดยการสกัดเจลาตินด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 45, 55 และ 65°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ผ่านชุดกรองสุญญากาศ เก็บส่วนที่เป็นของเหลวไว้ นำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.2 การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเจลาติน

การตรวจสอบคุณสมบัติของเจลาตินที่สกัดได้ ดังนี้

3.2.1 น้ำหนักเจลาตินที่ได้

3.2.2 ปริมาณความชื้น (AOAC, 1990)

3.2.3 ค่าความหนืด

3.2.4 ค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance , ANOVA) และความแตกต่างโดย Duncan multiple range test

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างหนังปลา

การแช่หนังปลาในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 M เป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง จะทำให้หนังปลามีลักษณะนิ่มและใสขึ้น หนังปลาสดก่อนแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะมีลักษณะนิ่มและมีสีขาวขุ่น มีเยื่อเมือก หนังปลาประกอบด้วยคอลลาเจน โปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและสารอื่นๆ หลังจากแช่หนังปลาในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 M เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หนังปลากระด้างเล็กน้อย สีของหนังปลาขาวขุ่น น้ำหนักของหนังปลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีการแทรกซึมเข้าไปในหนังปลาจึงทำให้น้ำหนักของหนังปลาเพิ่มมากขึ้นและหนังปลาจะมีความกระด้างมากกว่าหนังปลาก่อนแช่ เนื่องจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ละลายโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและสารอื่นๆ ออกไป การแช่หนังปลาในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง น้ำหนักของหนังปลาเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้เวลาแช่นานกว่า 8 ชั่วโมงน้ำหนักของหนังปลาจะค่อย ๆ ลดลง และขนาดเล็กลง ที่ความเข้มข้น 0.2 M เป็นเวลา 120 ชั่วโมง น้ำหนักของหนังปลาจะลดลงมากที่สุด หนังปลาจะมีลักษณะที่กระด้างเล็กน้อย สีของหนังปลาขาวใสขึ้น ดังตารางที่ 2.1 เนื่องจากโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของหนังปลาหลุดออกไปมาก จนอาจทำให้คอลลาเจนหลุดตามออกไปด้วย จึงทำให้ขนาดของหนังปลาเล็กลง ไม่สมบูรณ์ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาสกัดคอลลาเจนและปริมาณคอลลาเจนที่ได้จะน้อยกว่าที่ควรจะได้

ตารางที่ 2.1 น้ำหนัก (กรัม) ของหนังปลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 M เป็นเวลา 0 - 120 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของ NaOH (M)		
	0.05	0.1	0.2
0	17.96 ± 0.48 ^{efg}	17.37 ± 0.54 ^{def}	16.78 ± 0.68 ^{cde}
4	19.27 ± 0.36 ^{gh}	19.54 ± 0.63 ^{gh}	19.23 ± 0.36 ^{gh}
8	19.68 ± 1.26 ^h	21.24 ± 1.26 ^{ij}	21.85 ± 0.46 ^j
12	20.1 ± 0.08 ^{hi}	19.49 ± 0.20 ^{gh}	19.24 ± 0.45 ^{gh}
24	16.7 ± 0.75 ^{cde}	17.18 ± 1.05 ^{def}	17.89 ± 0.46 ^{efg}
48	17.28 ± 0.96 ^{def}	17.17 ± 0.74 ^{def}	17.41 ± 1.70 ^{def}
72	18.57 ± 1.46 ^{fgh}	16.18 ± 1.00 ^{bcd}	14.89 ± 0.90 ^b
96	18.65 ± 1.53 ^{fgh}	16.8 ± 1.18 ^{cde}	15.88 ± 0.85 ^{bcd}
120	16.45 ± 0.45 ^{bcde}	15.16 ± 0.33 ^{bc}	11.43 ± 0.67 ^a

^{a-b} คะแนนข้อมูลในแนวนอนที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหนังปลาแชลมอนในการสกัดคอลลาเจนและเจลาติน ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.8 M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หนังปลาที่ได้ใสพองตัวดี และสามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไปได้ จึงใช้สภาวะนี้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการสกัดคอลลาเจนและเจลาติน

2. ศึกษาสภาวะในการผลิตคอลลาเจนจากหนังปลาแชลมอน

2.1 การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติก

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 M ในอัตราส่วน 1: 10 (w/v) เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการแช่หนังปลาด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 M เป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง จะทำให้คอลลาเจนที่อยู่ในหนังปลาละลายออกมาและรวมอยู่ในสารละลายกรด เนื่องจากคอลลาเจนมีคุณสมบัติในการละลายในกรดที่เจือจางโดยปริมาณของคอลลาเจนจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ จากผลการทดลองคอลลาเจนที่ได้ เมื่อสกัดคอลลาเจนจากหนังด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 M เป็นเวลา 0 ชั่วโมง จะได้คอลลาเจน 0.18 ± 0.03 , $0.3 \pm$

0.06 และ 0.18 ± 0.04 กรัม ตามลำดับ การที่ได้ปริมาณคอลลาเจนที่น้อยเนื่องจากการที่สารละลายกรดยังไม่สามารถทำปฏิกิริยากับคอลลาเจนจากหนังปลาได้ทั้งหมด ทำให้คอลลาเจนที่มีอยู่ในหนังปลาละลายออกมาได้ในปริมาณที่น้อย การแช่หนังปลาด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 1.0 M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้คอลลาเจนมากที่สุด 1.12 ± 0.29 กรัม ดังตารางที่ 2.2 โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกนั้นจะใช้กรดที่มีความเข้มข้นและเวลาในการสกัดต่างกันขึ้นกับชนิดของตัวอย่าง ดังที่ ตรีสินธุ์ (2552) ใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M สกัดคอลลาเจนจากหนังปลานิลเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ขณะที่ นันทพร (2550) ใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M สกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสิวกุดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.2 น้ำหนักของคอลลาเจนแห้ง (กรัม) ที่ได้หลังจากการสกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.1 , 0.5 และ 1.0 M เป็นเวลา 0 , 4 , 8 , 12 , 24 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการสกัด (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของ acetic acid (M)		
	0.1	0.5	1
0	0.18 ± 0.03^a	0.30 ± 0.06^a	0.18 ± 0.04^a
4	0.27 ± 0.03^a	0.28 ± 0.04^a	0.22 ± 0.03^a
8	0.58 ± 0.05^{bc}	0.48 ± 0.06^b	0.27 ± 0.06^a
12	0.63 ± 0.10^{cd}	0.59 ± 0.05^{bc}	0.33 ± 0.03^a
24	0.75 ± 0.04^d	0.66 ± 0.03^{cd}	0.66 ± 0.04^{cd}
48	0.89 ± 0.06^e	0.68 ± 0.07^{cd}	1.12 ± 0.29^f

^{a-b}คะแนนข้อมูลในแนวนอนที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.2 การสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกร่วมกับเอนไซม์เปปซิน

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดอะซิติกร่วมกับเอนไซม์เปปซิน โดยการใช้เอนไซม์เปปซินเข้มข้นร้อยละ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.2 ที่เวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า การทดลองสกัดคอลลาเจนในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ผสมกับเอนไซม์เปปซิน 0 % พบว่าน้ำหนักของคอลลาเจนแห้งที่เวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.17 ± 0.00 , 0.18 ± 0.00 , 0.21 ± 0.04 , 0.19 ± 0.00 และ 0.21 ± 0.00 กรัม ตามลำดับ ซึ่งพบว่าลักษณะของคอลลาเจนก่อนนำไปทำแห้งที่เวลา 0 และ 12 ชั่วโมง มีลักษณะเหลว ไม่จับตัวกัน เป็นก้อนวุ้น มีสีใส และที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ลักษณะของคอลลาเจนที่ได้จะมีลักษณะเริ่มจับตัวกันเป็นก้อนวุ้นภายหลังจากการนำไปโคอะไลซิส ซึ่งที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง คอลลาเจนจะ

จับกันเป็นก้อนได้มากที่สุด และใสไม่มีสี เมื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งของคอลลาเจน พบว่าที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ได้น้ำหนักของคอลลาเจนมากที่สุด เท่ากับ 0.23 ± 0.05 กรัม

การทดลองสกัดคอลลาเจนในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ผสมกับเอนไซม์เปปซิน ร้อยละ 0.05 พบว่าน้ำหนักของคอลลาเจนแห้งที่เวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.11 ± 0.01 , 0.12 ± 0.02 , 0.21 ± 0.02 , 0.24 ± 0.01 , 0.35 ± 0.02 กรัมตามลำดับ ซึ่งพบว่าลักษณะของคอลลาเจนก่อนนำไปทำแห้งที่เวลา 0 ชั่วโมง มีลักษณะใส ไม่จับตัวกันเป็นก้อนวุ้น แต่ที่เวลา 12 ชั่วโมง มีลักษณะใส เริ่มจับตัวกันเป็นก้อนวุ้นเล็กน้อย และที่เวลา 24, 48 และ 72 ลักษณะของคอลลาเจนที่ได้จะมีลักษณะเริ่มจับตัวกันเป็นก้อนวุ้นหลังจากการนำไปไดอะไลซิส และมีสีขุ่นปนเหลืองเล็กน้อย และเมื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งของคอลลาเจน พบว่าที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้น้ำหนักของคอลลาเจนมากที่สุด เท่ากับ 0.35 ± 0.02 กรัม

การทดลองสกัดคอลลาเจนในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ผสมกับเอนไซม์เปปซิน ร้อยละ 0.10 พบว่าน้ำหนักของคอลลาเจนแห้งที่เวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.10 ± 0.01 , 0.13 ± 0.01 , 0.13 ± 0.02 , 0.14 ± 0.01 , 0.22 ± 0.02 กรัมตามลำดับ ซึ่งพบว่าลักษณะของคอลลาเจนก่อนนำไปทำแห้งที่เวลา 0 ชั่วโมง มีลักษณะใส ไม่จับตัวกันเป็นก้อนวุ้น และที่เวลา 12 ชั่วโมง มีลักษณะใส เริ่มจับตัวกันเป็นก้อนวุ้นเล็กน้อย และที่เวลา 24, 48 และ 72 ลักษณะของคอลลาเจนที่ได้จะมีลักษณะเริ่มจับตัวกันเป็นก้อนวุ้นหลังจากการนำไปไดอะไลซิส และมีสีขุ่นปนเหลืองเล็กน้อย และเมื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งของคอลลาเจน พบว่าที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้น้ำหนักของคอลลาเจนมากที่สุด เท่ากับ 0.22 ± 0.02 กรัม

การทดลองสกัดคอลลาเจนในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ผสมกับเอนไซม์เปปซิน ร้อยละ 0.15 พบว่าน้ำหนักของคอลลาเจนแห้งที่เวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.09 ± 0.00 , 0.13 ± 0.03 , 0.16 ± 0.03 , 0.15 ± 0.03 , 0.27 ± 0.02 กรัมตามลำดับ ซึ่งพบว่าลักษณะของคอลลาเจนก่อนนำไปทำแห้งที่เวลา 0 ชั่วโมง มีลักษณะใส ไม่จับตัวกันเป็นก้อนวุ้น และที่เวลา 12 ชั่วโมง มีลักษณะใส เริ่มจับตัวกันเป็นก้อนวุ้น และที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ลักษณะของคอลลาเจนที่ได้จะมีลักษณะเริ่มจับตัวกันเป็นก้อนวุ้นหลังจากการนำไปไดอะไลซิส และมีสีขุ่นปนเทาเล็กน้อย และเมื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งของคอลลาเจน พบว่าที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้น้ำหนักของคอลลาเจนมากที่สุด เท่ากับ 0.27 ± 0.02 กรัม

การทดลองสกัดคอลลาเจนในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ผสมกับเอนไซม์เปปซิน ร้อยละ 0.20 พบว่าน้ำหนักของคอลลาเจนแห้งที่เวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.12 ± 0.01 , 0.25 ± 0.04 , 0.24 ± 0.01 , 0.35 ± 0.00 , 0.32 ± 0.02 กรัมตามลำดับ ซึ่งพบว่าลักษณะของคอลลาเจนก่อนนำไปทำแห้งที่เวลา 0 ชั่วโมง มีลักษณะใส ไม่จับตัวกันเป็นก้อนวุ้น และที่เวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ลักษณะของคอลลาเจนที่ได้จะมีลักษณะเริ่มจับตัวกันเป็นก้อนวุ้นหลังจากการนำไปไดอะไลซิส และมีสีขุ่นปนเทาเล็กน้อย และเมื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งของคอลลาเจน

พบว่าที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ได้น้ำหนักของคอลลาเจนมากที่สุด เท่ากับ 0.35 ± 0.00 กรัม ดังตารางที่ 2.3 โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2.3 น้ำหนักของคอลลาเจนแห้ง (กรัม) ที่สกัดด้วยเอนไซม์เปปซิน

ระยะเวลาในการสกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณเอนไซม์เปปซิน (%)				
	0	0.05	0.1	0.15	0.2
0	0.17 ± 0.00^a	0.11 ± 0.01^a	0.10 ± 0.01^a	0.09 ± 0.00^a	0.12 ± 0.01^a
12	0.18 ± 0.00^b	0.12 ± 0.02^a	0.13 ± 0.01^b	0.13 ± 0.03^c	0.25 ± 0.04^b
24	0.21 ± 0.04^{ab}	0.21 ± 0.02^b	0.13 ± 0.02^b	0.16 ± 0.03^b	0.24 ± 0.01^b
48	0.19 ± 0.00^{ab}	0.24 ± 0.01^b	0.14 ± 0.01^b	0.15 ± 0.03^b	0.35 ± 0.00^c
72	0.21 ± 0.00^{ab}	0.35 ± 0.02^c	0.22 ± 0.02^c	0.27 ± 0.02^c	0.32 ± 0.02^a

^{a-b} คะแนนข้อมูลที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการทดลองเปรียบเทียบผลผลิตของน้ำหนักคอลลาเจนแห้งที่สกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลาต่าง ๆ นั้น พบว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์และเวลามีผลต่อการสกัดคอลลาเจน และเนื่องจากการสกัดคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกนั้นจะใช้กรดที่มีความเข้มข้นและเวลาในการสกัดต่างกันขึ้นกับชนิดของตัวอย่าง ดังที่ ตรีสินธุ์ (2552) ใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M สกัดคอลลาเจนจากหนังปลานิลเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ขณะที่ นันทพร (2550) ใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 M สกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสิ่กูดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเอนไซม์เปปซินมีส่วนในการช่วยย่อยโปรตีนเนื่องจากเอนไซม์เปปซินจะสามารถทำงานได้ที่ pH ต่ำ (pH 2-3) ซึ่งเอนไซม์เปปซินจะมีประสิทธิภาพในการละลายเส้นใยคอลลาเจน ที่ pH ดังกล่าวเส้นใยคอลลาเจนจะพองตัวทำให้ส่วนที่โลเปปไทด์ ถูกกำจัดได้ง่ายขึ้น (Swan and Torley, 1991) ที่สภาวะการสกัดด้วยเอนไซม์ร้อยละ 0.05 เวลา 72 ชั่วโมง ให้ผลผลิตคอลลาเจนเท่ากับที่สภาวะการสกัดด้วยเอนไซม์ร้อยละ 0.2 เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งทั้งสองสภาวะการสกัดให้น้ำหนักคอลลาเจนมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสภาวะการสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 0.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ของคอลลาเจนที่ได้

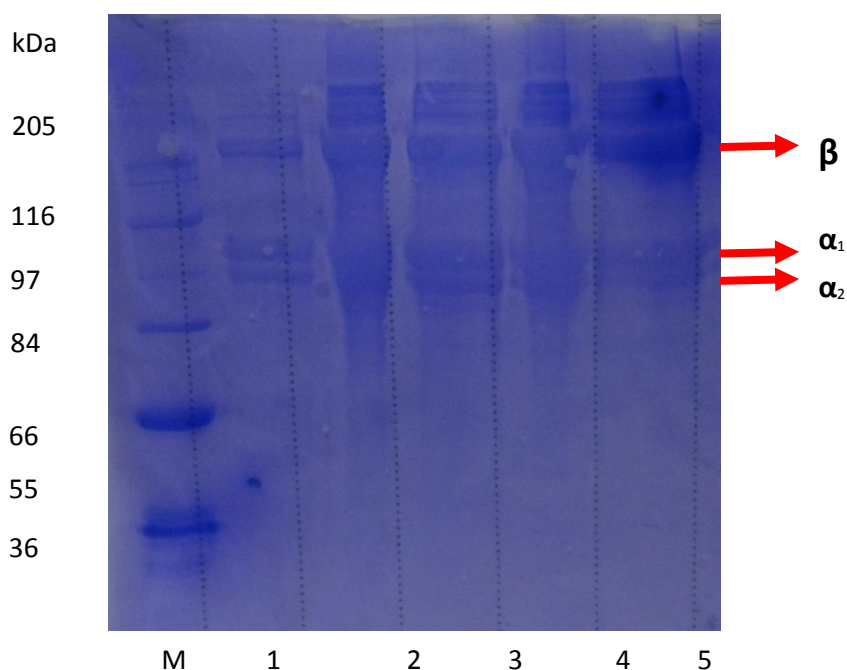
เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนแห้งที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี PSC พบว่าคอลลาเจนจากหนังปลาแชลมอนมีปริมาณร้อยละ 3.5 ซึ่งน้อยกว่าผลผลิตคอลลาเจน (ร้อยละ) จากปลา

Black drum (15.8) ปลา balloon fish (19.5) ปลา largefin longbarbel catfish (28) ปลา channel catfish (38.4) ปลา ocellate puffer fish (44.7) และ nautilus (50)

2.3 การตรวจสอบคุณสมบัติของคอลลาเจน

2.3.1 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและชนิดของคอลลาเจนที่สกัดได้

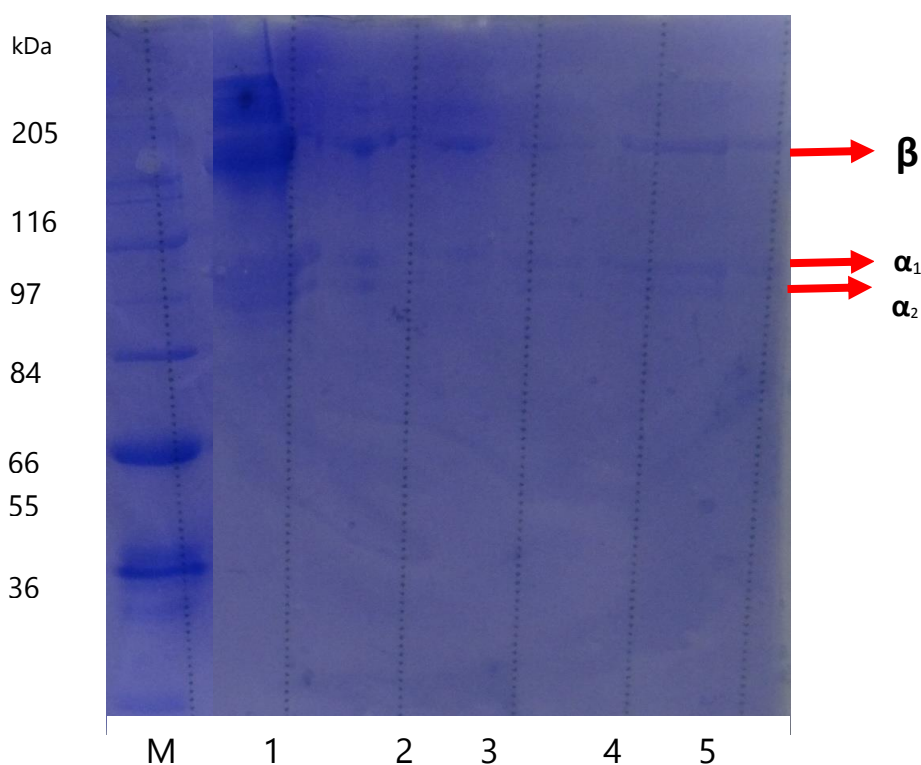
การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินร้อยละ 0 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และตกตะกอนคอลลาเจนโดยปรับให้สารละลายมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 1.1 M พบว่า คอลลาเจนที่ได้เป็นคอลลาเจน type I ประกอบด้วยสาย α_1 จำนวน 2 สายและสาย α_2 จำนวน 1 สาย (Friess, 1998) ซึ่งแสดงว่าการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนที่ได้ ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 คอลลาเจนบน 7.5% SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

Lane M : protein marker, Lane 1: 0 ชั่วโมง, Lane 2: 12 ชั่วโมง, Lane 3: 24 ชั่วโมง, Lane 4: 48 ชั่วโมง, Lane 5: 72 ชั่วโมง

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์ เปปซินร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงและตกตะกอนคอลลาเจนโดยปรับให้ สารละลายมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 1.1 M พบว่า คอลลาเจนที่ได้เป็นคอลลาเจน type I ประกอบด้วยสาย α_1 จำนวน 2 สายและสาย α_2 จำนวน 1 สาย (Friess ,1998) ซึ่งแสดงว่า การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนที่ได้ ดังภาพที่ 2.2

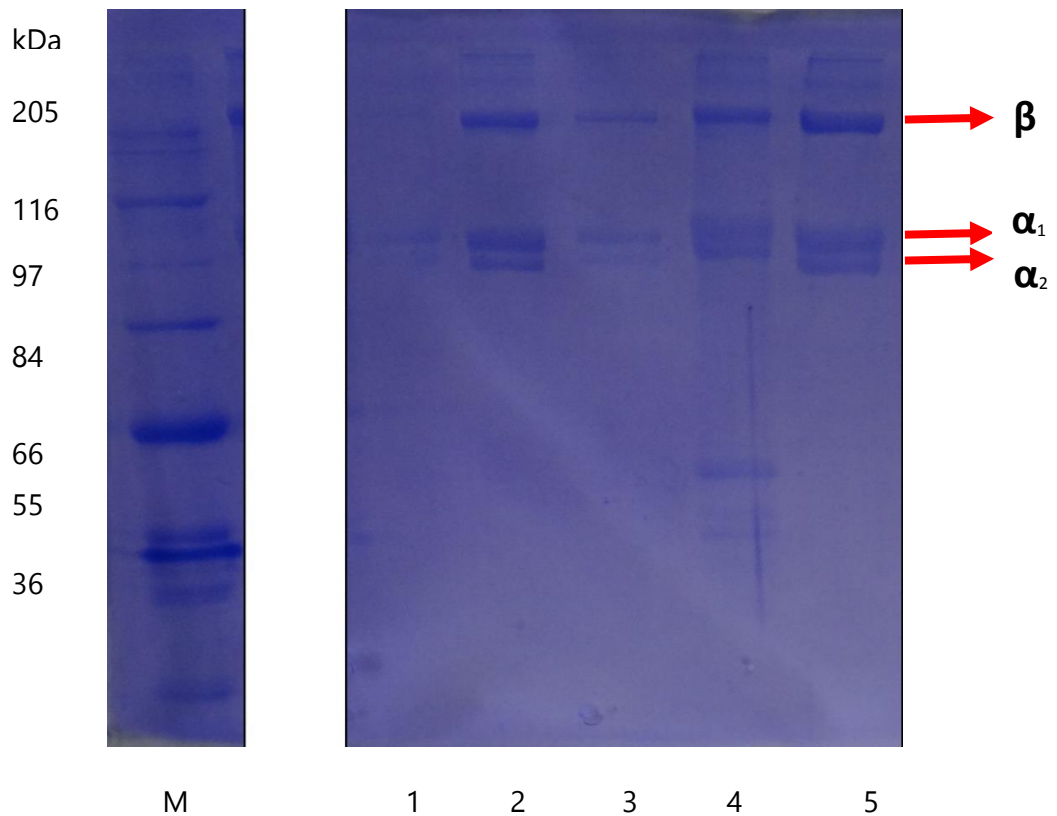


ภาพที่ 2.2 คอลลาเจนบน 7.5% SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

Lane M: protein marker, Lane 1: 0 ชั่วโมง, Lane 2: 12 ชั่วโมง, Lane 3: 24 ชั่วโมง, Lane 4: 48 ชั่วโมง, Lane 5: 72 ชั่วโมง

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์ เปปซินร้อยละ 0.10 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงและตกตะกอนคอลลาเจนโดยปรับให้ สารละลายมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 1.1 M พบว่า คอลลาเจนที่ได้เป็นคอลลาเจน

type I ประกอบด้วยสาย α_1 จำนวน 2 สายและสาย α_2 จำนวน 1 สาย (Friess ,1998) ซึ่งแสดงว่าการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนที่ได้ ดังภาพที่ 2.3

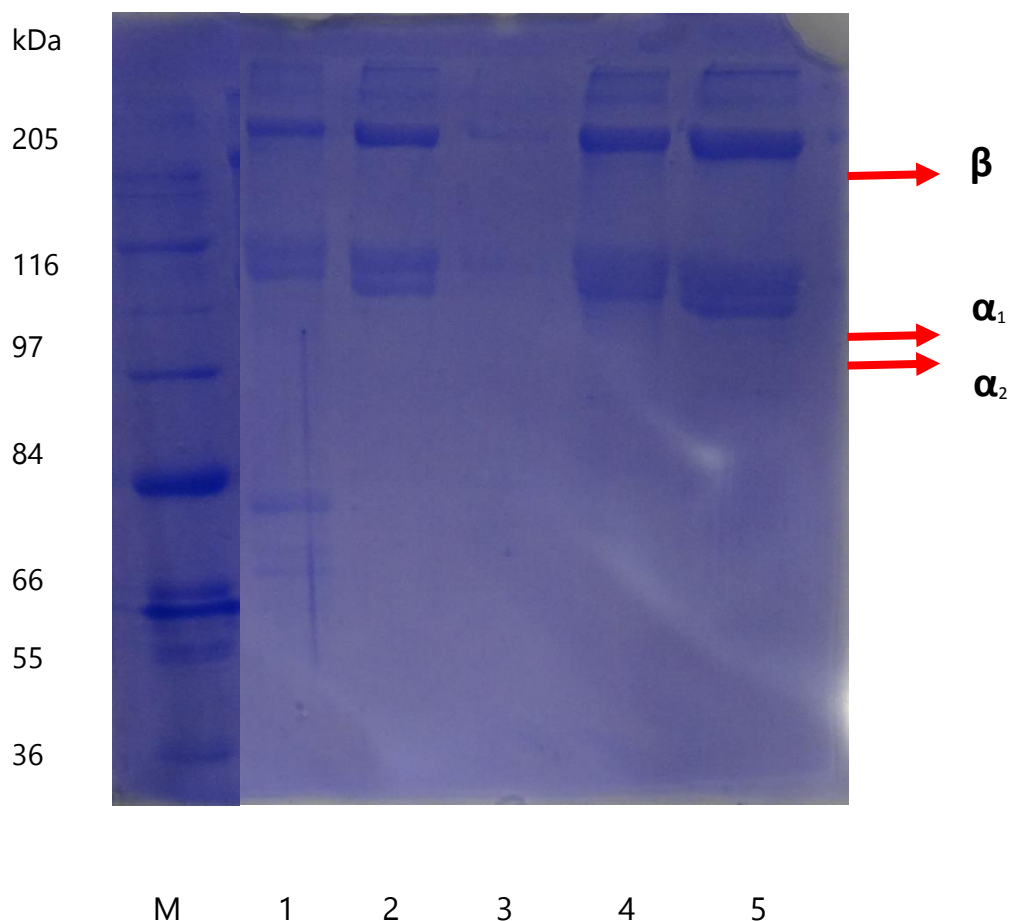


ภาพที่ 2.3 คอลลาเจนบน 7.5% SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.10 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

Lane M: protein marker, Lane 1: 0 ชั่วโมง, Lane 2: 12 ชั่วโมง, Lane 3: 24 ชั่วโมง, Lane 4: 48 ชั่วโมง, Lane 5: 72 ชั่วโมง

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินร้อยละ 0.15 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงและตกตะกอนคอลลาเจนโดยปรับให้สารละลายมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 1.1 M พบว่า คอลลาเจนที่ได้เป็นคอลลาเจน type I ประกอบด้วยสาย α_1 จำนวน 2 สายและสาย α_2 จำนวน 1 สาย (Friess ,1998) ซึ่งแสดงว่า

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนที่ได้ดังภาพที่ 2.4

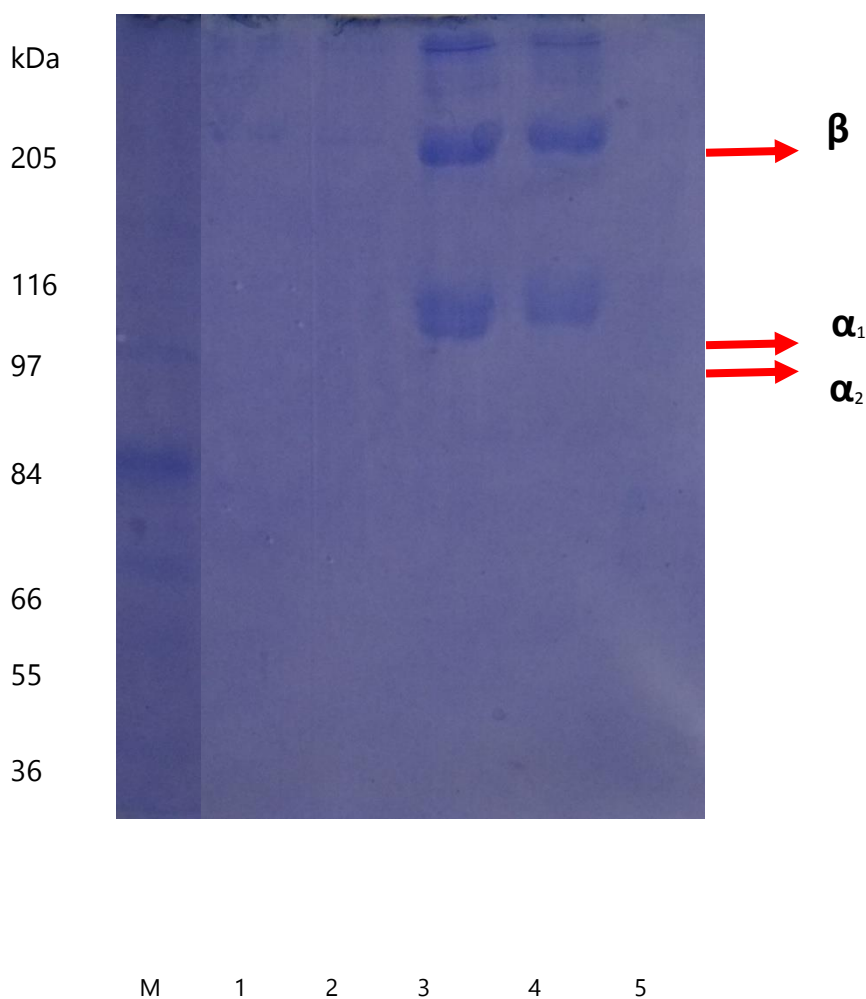


ภาพที่ 2.4 คอลลาเจนบน 7.5% SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.15 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

Lane M: protein marker, Lane 1: 0 ชั่วโมง, Lane 2: 12 ชั่วโมง, Lane 3: 24 ชั่วโมง, Lane 4: 48 ชั่วโมง, Lane 5: 72 ชั่วโมง

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินร้อยละ 0.20 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงและตกตะกอนคอลลาเจนโดยปรับให้สารละลายมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 1.1 M พบว่า คอลลาเจนที่ได้เป็นคอลลาเจน type I ประกอบด้วยสาย α_1 จำนวน 2 สายและสาย α_2 จำนวน 1 สาย (Friess ,1998) ซึ่งแสดงว่า

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนที่ได้ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 คอลลาเจนบน 7.5% SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.20 เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

Lane M: protein marker, Lane 1: 0 ชั่วโมง, Lane 2: 12 ชั่วโมง, Lane 3: 24 ชั่วโมง, Lane 4: 48 ชั่วโมง, Lane 5: 72 ชั่วโมง

จากการเปรียบเทียบชนิดของคอลลาเจนที่พบในหนังปลา โดยวิธี SDS-PAGE เมื่อนำคอลลาเจนที่ได้จากหนังปลาแชลมอนที่สกัดจากสารละลายกรดอะซิติก ร่วมกับเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 ในระยะเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมา

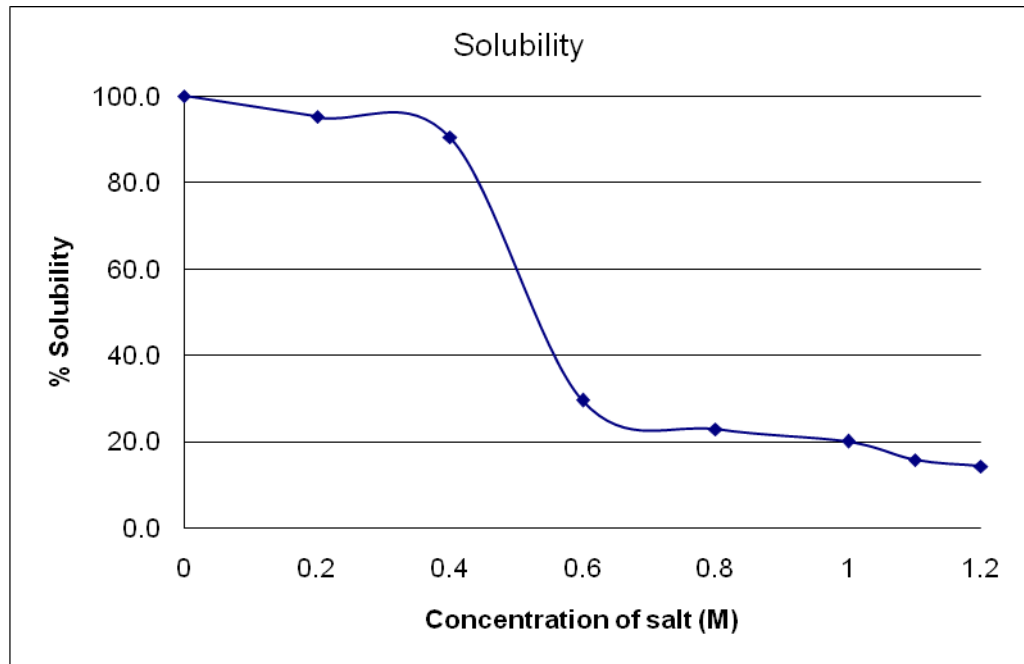
วิเคราะห์น้ำหนักและชนิดของคอลลาเจนด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งจากการสกัดทั้งหมด พบว่ามีแถบโปรตีนที่แสดงผลยืนยันว่าเป็นคอลลาเจน จะพบแถบของโปรตีน 3 แถบคือ β , α_1 และ α_2 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 215, 114 และ 109 kDa ตามลำดับ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับคอลลาเจนจากหนังลูกวัวซึ่งเป็นคอลลาเจน type I จะพบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งการที่น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนทั้ง 3 แถบคือ β , α_1 และ α_2 ที่แตกต่างกัน เกิดจากความคลาดเคลื่อนในการวัดแถบโปรตีนของเทคนิคในการทำ SDS-PAGE แต่ละบุคคล ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 คอลลาเจนที่พบในหนังปลา โดยวิธี SDS-PAGE

ชนิดของปลา	น้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจน (kDa)		
	β	α_1	α_2
หนังปลาแชลมอน	215	114	109
หนังลูกวัว (ตรีสินธุ์, 2552)	\approx 230	116.45	109.38
หนังปลานิล (ตรีสินธุ์, 2552)	\approx 225	117.13	105.51
หนังปลาสีกูด (นันทพร, 2550)	\approx 225	135	120

2.3.2 ความสามารถในการละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์

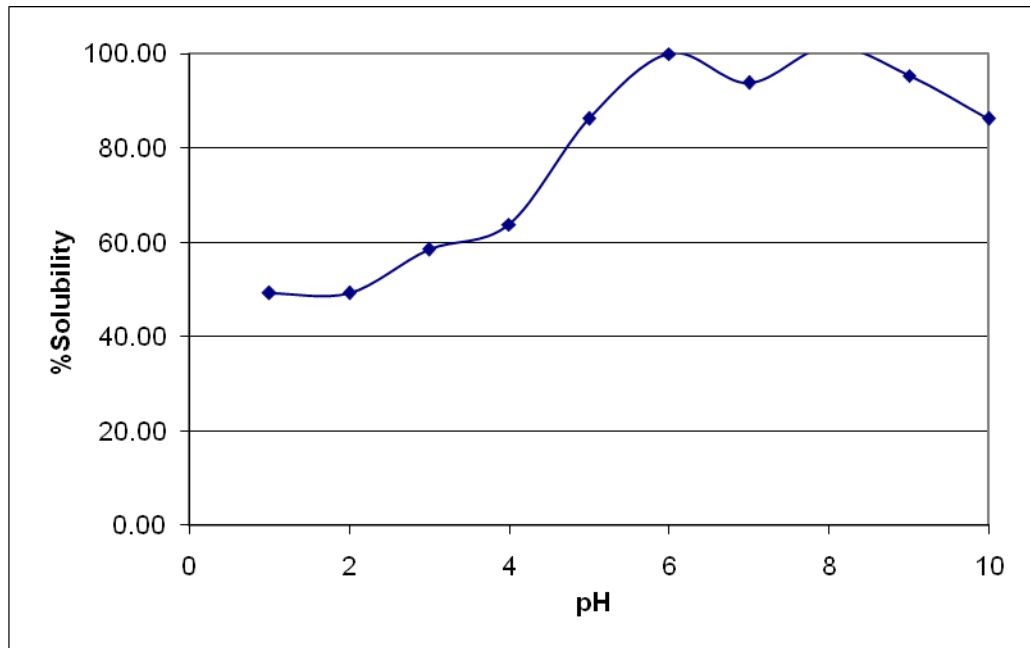
ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0-0.2 M (0-0.1 กรัม) จะลดลงตามความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 2.6 สอดคล้องกับความสามารถในการละลายของคอลลาเจนจากปลาปักเป้า (Huang *et al.*, 2011) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของคอลลาเจนที่จะตกตะกอนที่โซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้นระดับหนึ่ง โดยในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาแชลมอนจะตกตะกอนคอลลาเจนด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.1 M



ภาพที่ 2.6 ความสามารถในการละลายในโซเดียมคลอไรด์

2.3.3 ความสามารถในการละลายในสถานะที่มี pH ต่างกัน

ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนจากปลาแชลมอนในสารละลาย pH 1 - 10 จะเพิ่มขึ้นตามค่าความเป็นเบสที่เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 2.7 แตกต่างจากคอลลาเจนจากปลาปักเป้า (Huang *et al.*, 2011) ที่ละลายได้ดีในสถานะที่เป็นกรด คอลลาเจนจากหนังปลาแชลมอนจะจับตัวกันได้เป็นก้อนในช่วง pH 1-5 ขณะที่ pH 6 - 8 มีการจับตัวกันของโปรตีนเป็นตะกอนเล็กน้อย ช่วง pH 6 - 8 คอลลาเจนจากหนังปลาแชลมอนจะละลายได้ดีที่สุด



ภาพที่ 2.7 ความสามารถในการละลายใน pH ต่าง ๆ

3. ศึกษาสถานะในการผลิตเจลาตินจากหนังปลาแชลมอน

3.1 องค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาแชลมอน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาแชลมอน ก่อนนำไปสกัดเจลาติน พบว่ามีปริมาณความชื้น ร้อยละ 68.14 ± 2.55 โปรตีน ร้อยละ 28.54 ± 2.15 เถ้า ร้อยละ 3.12 ± 0.23 ไขมัน ร้อยละ 0.19 ± 0.01 และคาร์โบไฮเดรต 0.01 ± 0.00 (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของหนังปลาแชลมอน

องค์ประกอบ	ปริมาณ(%)
ความชื้น	68.14±2.55
โปรตีน	28.54±2.15
ไขมัน	0.19±0.01
เถ้า	3.12±0.23
คาร์โบไฮเดรต	0.01±0.00

3.2 สมบัติเบื้องต้นของเจลาตินที่สกัดได้

3.2.1 ลักษณะปรากฏของเจลาติน

ลักษณะปรากฏของเจลาตินที่สกัดอุณหภูมิ 45°C จะมีลักษณะใส เปราะ แตกหักง่าย ส่วนเจลาตินที่สกัดอุณหภูมิ 55 และ 65°C จะมีลักษณะปรากฏที่คล้ายกัน คือ มีลักษณะขุ่นเล็กน้อย แข็งเปราะ โดยเจลาตินทั้งหมดมีกลิ่นคาวจากหนังปลา

3.2.2 ปริมาณเจลาตินแห้ง

การสกัดเจลาตินจากหนังปลาแชลมอนตั้งต้น 100 กรัม ที่ผ่านการปรับสภาพหนังปลาโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.8 M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่ง pH ของน้ำล้างเป็นกลาง จากนั้นนำหนังปลาที่ได้มาสกัดเจลาตินโดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 45, 55 และ 65°C แล้วนำสารละลายเจลาตินที่ได้ในแต่ละอุณหภูมิ ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักเจลาตินแห้ง มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 2.98 ± 0.30 , 6.35 ± 0.21 และ 10.81 ± 0.69 ตามลำดับ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่ออุณหภูมิในการสกัดเพิ่ม ส่งผลให้ได้น้ำหนักเฉลี่ยของเจลาตินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 2.6) ซึ่งสอดคล้องกับ Andreeva (1971) ได้

ศึกษาการสกัดเจลาตินจากหนังปลาคอด พบว่าผลผลิต ของเจลาตินเมื่อมีการใช้อุณหภูมิในการสกัดที่สูงจะได้ปริมาณผลผลิตมากขึ้นเนื่องจากคอลลาเจนถูกความร้อนที่สูงขึ้นเปลี่ยนสภาพโครงสร้างทำให้ได้ฟอร์มตัวเป็นเจลาตินได้ง่ายขึ้น โดยอุณหภูมิและผลผลิตจะแปรตามกัน นอกจากนี้ Harris (1990) ได้รายงานไว้ว่า การสกัดเจลาตินที่อุณหภูมิสูงๆ ส่งผลให้ได้ผลผลิตเจลาตินในปริมาณมาก ส่วนการสกัดที่อุณหภูมิต่ำส่งผลให้ได้ผลผลิตเจลาตินในปริมาณน้อย และถ้าใช้ pH ต่ำๆ ในการสกัด จะส่งผลให้ได้ผลผลิตเจลาตินในปริมาณมาก แต่มีคุณสมบัติทางกายภาพไม่ดี

อย่างไรก็ตามการปรับสภาพหนังปลาก่อนสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.8 M เป็นเวลา 3 ชั่วโมงนั้น เมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ 65°C ยังให้ผลผลิตของเจลาตินที่น้อยอยู่ ซึ่ง Cho *et al.* (2006) ได้รวบรวมข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดเจลาตินจากปลาชนิดต่างๆ โดยแต่ละงานวิจัยมีการปรับสภาพวัตถุดิบมีทั้งที่ใช้ต่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และกรด เช่น กรดซิตริก กรดซัลฟิวริก และกรดซิตริก หรือใช้กรดและต่างร่วมกัน ตามด้วยการสกัดที่ 45-70°C โดยระยะเวลาที่ใช้อยู่ในช่วง 2-18 เซนติเมตร พบว่า ผลผลิตเจลาตินที่ได้อยู่ในช่วงร้อยละ 6.5-23 ซึ่งแตกต่างกันไปตามสภาวะที่สกัดและชนิดของปลา การสกัดเจลาตินจากปลาเขตน้ำเย็น เช่น ปลาคอด และปลาแชลมอน จะได้เจลาตินค่อนข้างน้อย

นอกจากนี้การใช้สารละลายต่างที่มีความรุนแรงเกินไปจะทำให้คอลลาเจนละลายได้ในน้ำเย็น ดังนั้นการล้างวัตถุดิบในขั้นตอนต่อมาจะทำให้คอลลาเจนถูกชะออกไปด้วย ส่งผลให้ผลผลิตเจลาตินลดลง (Cho *et al.*, 2006; Schrieber and Gareis, 2007)

3.2.3 ปริมาณความชื้นของเจลาตินแห้ง

จากการทดลองหาความชื้นของเจลาตินที่สกัดได้หลังจากอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า เจลาตินที่สกัดที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C มีความชื้นเฉลี่ยเท่ากับ 4.45 ± 0.25 , 5.98 ± 0.17 และ 6.02 ± 0.40 ตามลำดับ โดยปริมาณความชื้นของเจลาตินที่ได้จากการทดลองมีค่าน้อยกว่าเจลาตินทั่วไป ซึ่ง The committee of textbooks of the American meat institute (1958) ได้กล่าวไว้ว่า เจลาตินจะมีความชื้นอยู่ที่ร้อยละ 7-15 ขึ้นกับเวลาในการอบแห้ง ภาชนะที่ใช้บรรจุเจลาติน ความชื้นของห้องที่ใช้เก็บรักษา และระยะเวลาในการเก็บรักษา ในขณะที่ Schrieber and Gareis (2007) พบว่า สารละลายเจลาตินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และขจัดแร่ธาตุแล้วมีน้ำประมาณร้อยละ 95 ในขณะที่เจลาตินแห้งต้องมีน้ำไม่เกินร้อยละ 10-12 เพื่อให้มีอายุการเก็บไม่จำกัดในด้านจุลชีววิทยา นอกจากนี้สารละลายเจลาตินเจือจางยังสิ้นเปลืองเนื้อที่ในการเก็บรักษาและขนส่งยาก การทำให้สารละลายเจลาตินเข้มข้นนิยมใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporator)

3.2.4 ความหนืด

เตรียมเจลลาตินแห้ง 7.5 ± 0.01 กรัม ในน้ำกลั่นจำนวน 105 มิลลิลิตร โดยปล่อยสารละลาย เจลาตินให้เกิดการพองตัวอย่างสมบูรณ์ ประมาณ 2 ชั่วโมง ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C จนกระทั่ง เจลาตินละลายอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดค่าความหนืดโดยใช้ชุด RV ความเร็วรอบ 220 พบว่า เจลาตินที่ สกัดที่อุณหภูมิ 45 , 55 และ 65°C มีค่าความหนืดเท่ากับ 40.88 ± 0.35 , 37.01 ± 0.22 และ 35.94 ± 0.02 cp ตามลำดับ

3.2.5 ความแข็งแรงของเจล

เตรียมเจลลาตินแห้ง 7.5 ± 0.01 กรัม ในน้ำกลั่นจำนวน 105 มิลลิลิตร โดยปล่อยสารละลาย เจลาตินให้เกิดการพองตัวอย่างสมบูรณ์ ประมาณ 2 ชั่วโมง นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้สารละลายเจลาตินเย็นตัวลง นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10°C 16-18 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบด้วยเครื่อง Texture Analysis หัว P0.5 จากการทดลองพบว่า เจลาตินที่ สกัดได้ที่อุณหภูมิ 45 , 55 และ 65°C มีค่าความแข็งแรงของเจลเฉลี่ย เท่ากับ 12.80 ± 0.20 , 12.77 ± 0.35 และ 10.17 ± 0.15 กรัม ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 45°C และ 55°C มีค่าความแข็งแรงของ เจลไม่แตกต่างกันทางมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่เจลาตินที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 65°C มีค่าความ แข็งแรงน้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเกิดจากที่อุณหภูมิ 65°C นั้น เจลาตินเกิดไฮโดรไลซิสเนื่องจากความร้อน ส่งผลให้เจลาตินมีสมบัติทางกายภาพลดลง (Eysturskard *et al.*, 2009)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น ความหนืดและความแข็งแรงของเจลของ เจลาตินจะแปรผันตามกัน หากค่าความหนืดสูง ค่าความแข็งแรงของเจลก็จะสูงตามและคุณสมบัติ สองประการนี้เป็นคุณสมบัติสำคัญที่บ่งบอกถึงลักษณะที่ดีของเจลาติน (Ward, 1977)

นอกจากนี้ความหนืดเป็นสมบัติที่สำคัญอันดับสองของเจลาติน ขึ้นอยู่กับการใช้งาน โดยใน การผลิตลูกกวาดที่ต้องขึ้นรูปจะนิยมใช้ เจลาตินชนิดความหนืดต่ำเพื่อป้องกันการไหลตามเป็นเส้น (tailing effect) ในขณะที่การผลิตฟิล์มเจลาตินนิยมใช้เจลาตินความหนืดสูงมากกว่าชนิดที่มีความ หนืดต่ำ และสมบัติการเกิดฟิล์มของเจลาตินถูกนำมาใช้ในการผลิตแคปซูลยาทั้งชนิดแข็งและอ่อน ฟิล์มเจลาตินมักจะหดตัวระหว่างการทำให้แห้ง ดังนั้นจึงมักเติมแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซีหลายหมู่ (polyhydric alcohols) เพื่อปรับปรุงการยึดติดและความยืดหยุ่นของฟิล์มเจลาติน (Cole, 2000)

ตารางที่ 2.6 สมบัติเบื้องต้นของเจลลาตินที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C

อุณหภูมิ สกัด (°C)	ลักษณะ ปรากฏ	น้ำหนัก เจลลาตินแห้ง (ร้อยละ)	ความชื้น (ร้อยละ)	ความหนืดเฉลี่ย		ความแข็งแรง ของเจล (กรัม)
				(cp.)	Torque (%)	
45	ใส เปราะ	2.98 ^a ±0.30	4.45 ^a ±0.25	40.88 ^c ±0.35	88.67±0.38	12.80 ^b ±0.20
55	ขุ่นเล็กน้อย แข็งเปราะ	6.35 ^b ±0.21	5.98 ^b ±0.17	37.01 ^b ±0.22	89.53±0.85	12.77 ^b ±0.35
65	ขุ่นเล็กน้อย แข็งเปราะ	10.81 ^c ±0.69	6.02 ^b ±0.40	35.94 ^a ±0.02	73.13±0.40	10.17 ^a ±0.15

a, b, c คะแนนข้อมูลที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)



ต้นทุนการผลิต

1. การผลิตคอลลาเจนแห้ง 1 กิโลกรัม มีต้นทุนการผลิตดังนี้
 - 1.1 ตัวอย่างหนังปลา 28,571 กิโลกรัม เป็นเงิน 571,420 บาท
 - 1.2 สารเคมี เป็นเงิน 10,000 บาท
 - 1.3 ค่าสาธารณูปโภค เป็นเงิน 2,000 บาท
 - รวมเป็นเงิน 583,420 บาท

2. การผลิตเจลาตินแห้ง 1 กิโลกรัม มีต้นทุนการผลิตดังนี้
 - 2.1 ตัวอย่างหนังปลา 15,748 กิโลกรัม เป็นเงิน 314,960 บาท
 - 2.2 ค่าสาธารณูปโภค เป็นเงิน 1,000 บาท
 - รวมเป็นเงิน 315,960 บาท



สรุปผลการวิจัย

1. สภาวะในการเตรียมวัตถุดิบ คือ แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.8M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจน คือ การสกัดคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซินร้อยละ 0.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คอลลาเจนที่ได้มีผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 3.5 ของน้ำหนักแห้งพลาสติก และพบแถบโปรตีน 3 แถบของคอลลาเจนชนิด β , α_1 , และ α_2 คอลลาเจนที่ได้มีคุณสมบัติเป็นคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่พบในผิวหนังมนุษย์ จึงเหมาะที่จะนำมาสมานแผลที่ผิวหนัง
3. สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังปลาแชลมอน คือ ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นโดยใช้อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยได้ผลผลิตเจลาติน ร้อยละ 6.35 มีคุณสมบัติด้านความหนืด 37.01 cp และความแข็งแรงของเจล 12.77 กรัม ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นฟิล์มเจลาตินหรือแคปซูลทางการบรรจุในลำดับต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. คอลลาเจนที่ได้เหมาะที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมานแผลที่ผิวหนัง
2. เจลาตินที่ได้เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นฟิล์มเจลาตินหรือแคปซูลทางการบรรจุ
3. พัฒนาคอลลาเจนและเจลาตินเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การเคลือบผิวผลิตภัณฑ์ และอุตสาหกรรมอาหารประเภทอื่น ๆ

สรุปแผนงานวิจัย

โครงการวิจัยที่ 2 การสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากเศษเหลือของการแปรรูปปลาแชลมอน

แผนงานวิจัย	ผลที่ได้
<p>1. ศึกษาสภาวะในการเตรียมตัวอย่าง</p> <p>1.1 การเตรียมตัวอย่างด้วยสารเคมี ได้แก่ [NaOH] และเวลา</p>	<p>1.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหนังปลาแชลมอนในการสกัดคอลลาเจนและเจลาติน โดยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.8 M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หนังปลาที่ได้ใส และพองตัวดี</p>
<p>2. ศึกษาสภาวะในการผลิตคอลลาเจนจากหนังปลาแชลมอน</p> <p>2.1 ศึกษาสภาวะในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาแชลมอน ได้แก่ [Acetic acid], ปริมาณเอนไซม์ และเวลา</p>	<p>2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนโดยการใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1.0 M ร่วมกับเอนไซม์เปปซิน 0.2 % ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลผลิตคอลลาเจนร้อยละ 3.5</p>
<p>2.2 การตรวจสอบคุณสมบัติของคอลลาเจน ได้แก่ การละลาย และชนิดของคอลลาเจน</p>	<p>2.2 คอลลาเจนจากหนังปลาแชลมอนมีคุณสมบัติด้านการละลายเหมือนคอลลาเจนทั่วไป มีองค์ประกอบเป็น β, α_1 และ α_2 คอลลาเจนจากหนังปลาแชลมอนเป็น collagen type I ซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้กับการสมานบาดแผล เพราะเป็นคอลลาเจนชนิดเดียวกับผิวหนังของมนุษย์</p>
<p>3. ศึกษาสภาวะในการผลิตเจลาตินจากหนังปลาแชลมอน</p> <p>3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังปลา ได้แก่ อุณหภูมิ</p> <p>3.2 วิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้นของเจลาตินที่ได้ ได้แก่ ความหนืด และความแข็งแรงของเจล</p>	<p>3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังปลา สกัดด้วยน้ำกลั่นโดยใช้อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเจลาตินร้อยละ 6.35</p> <p>3.2 คุณสมบัติเบื้องต้นของเจลาตินที่ได้ มีความหนืด 37.01 cp และความแข็งแรงของเจล 12.77 กรัม เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นฟิล์มเจลาตินหรือแคปซูลทางการบรรจุ</p>



เอกสารอ้างอิง

- ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์. 2551. คอลลาเจนจากเกล็ดปลา: การสกัดและคุณสมบัติบางประการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ตรีสินธุ์ โภธารส. 2552. การใช้คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลานิลเป็นส่วนผสมของครีม **ประอรพิว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นันทพร อัครนิจ. 2550. การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาสีกูดและลักษณะบางประการของ **คอลลาเจนที่สกัดได้**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Andreeva, A.P., 1971. Thermostability of cutaneous collagen of some species and subspecies of the cod family. *Tsitologiya* 13, 1004–1008.
- Cho, S.H., Jahncke, M.L., Chin, K.B., and Eun, J.B. (2006). The effect of processing conditions on the properties of gelatin from skate (*Raja Kenojei*) skins. *Food Hydrocolloids*, 20 : 810–816.
- Cole, C.G.B. (2000). Gelatin. in Frederick, J.F. (ed.). *Encyclopedia of Food Science and Technology*, 2nd ed. New York : John Wiley & Sons.
- Eysturskard, J., Haug, I.J., Elharfaoui, N., Djabourov, M., and Draget, K.I. (2009). Structural and mechanical properties of fish gelatin as a function of extraction conditions. *Food Hydrocolloids*, 23 : 1702-1711.
- Friess, W. 1998. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European J. Pharma. And Biopharma.** 45: 113-136.
- Harris, P. 1990. *Food Gels:Gelatine*. Elsevier Applied Science, London. 476 p. Hudson (eds). *Development in Food Protein 4*. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Huang, Y. R., C. Y. Shiau, H. Chen and B. C. Huang. 2011. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). **Food Hydrocolloids** 25: 1507-1513.
- Nagai, T., Y. Araki and N. Suzuki. 2002. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). **Food Chem.** 78: 173-177.
- Ockerman, H.W. 1988. **Animal by product processing**. Ellis Horwood international publishers in science and technology.
- Schrieber, R., and Gareis, H. (2007). *Gelatine Handbook: Theory and Industrial*



Practice. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

Swan, J.E. and P.J. Torley. 1991. **Collagen Structure, Function and Uses**. Meat Research Institute of New Zealand Inc., Hamilton.

Takai M, Shimizu Y, Shimizu J, et al (1997). **Wound healing composition using squid chitin and fish skin collagen**. Japan patent application 669,956.

The committee of textbooks of the American meat institute. 1958. By – Products of the Meat Packing Industry. Institute of Meat packing University of Chicago, Chicaco. 418 p.

Ward, A. G., and A. Courts. 1977. The Science and Tecnology of gelatin. Academic Press, London. 564p.