สมบัติบางส่วนของคอลลาเจน จากปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*)

Partial Properties of Pepsin-Soluble Collagen from Black Sea Cucumber (*Holothuria leucospilota*)

วิจิตรา ตุ้งซี่* และศรัณย์ รักษาพราหมณ์

โปรแกรมวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Wijittra Tungse and Sarun Rucksapram*

Program in Aquaculture, Faculty of Agricultural Technology, Songkhla Rajabhat University,

Khao-Roob-Chang, Muang, Songkhla 90000

บทคัดย่อ

การศึกษาบางสมบัติของคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) พบว่าผนังลำตัวของปลิงทะเลดำ 100 กรัม ของน้ำหนักเปียก สามารถสกัดคอลลาเจนหยาบได้ 10.95 กรัม ของน้ำหนักแห้ง และสามารถสกัด pepsin-solubilized collagen (PSC) จากคอลลาเจนหยาบได้ประสบผลสำเร็จ ปริมาณค่อนข้างสูง คือ ร้อยละ 66.46 การตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่าเป็นคอลลาเจน type I ประกอบด้วยสายเปปไทด์ α_1 มีมวลโมเลกุลประมาณ 150 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีน โปรลีน และไฮดรอกซีโปรลีน ร้อยละ 20.3, 8.8 และ 7.0 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ มีค่า transition temperature (T_{max}) เท่ากับ 50.88 องศาเซลเซียส สามารถดูดกลืนแสงยูวีสูงสุดที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และมีค่าการละลายสูงสุดที่พีเอช 1

คำสำคัญ : ปลิงทะเลดำ; คอลลาเจนที่ละลายด้วยเอนไซม์เปปซิน; การสกัด

Abstract

Study on some properties of collagen from black sea cucumber (*Holothuria leucospilota*). It was found that 10.95 gram dry weight of extracted crude collagen were obtained from 100 gram wet weight of *H. leucospilota* body wall. As high as 66.46 % of pepsin-solubilized collagen (PSC) were successfully isolated from the crude collagen fibril of *H. leucospilota*. SDS-PAGE that was protein and eletrophoretic pattern of type I collagen consisting of major component $\underline{\alpha}_1$ of approximately 150 kDa. PSC composed of 20.3 % glycine, 8.8 % proline and 7.0 % hydroxyproline.

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** wijittra.tu@skru.ac.th

PSC exhibited transition temperature (T_{max}) at 50.88 °C. The maximum UV absorbance at 235 nm and PSC had the highest solubility at pH 1.

Keywords: *Holothuria leucospilota*; pepsin-soluble collagen; extraction

1. บทนำ

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใยยาว (fibrous protein) ไม่ละลายน้ำ ประกอบขึ้นด้วยสายพอลิเพปไทด์ 3 สาย แต่ละสายพอลิเพปไทด์เป็นสายเกลียว ทั้งสามสายยึดกันแน่น และมีไกลซีนเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุด จึงมีบทบาทเด่นในโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใย ซึ่งในคอลลาเจนพบไกลซีนอยู่ในทุกตำแหน่งที่สาม สายเกลียวทั้งสามสายจะเก็บส่วนไกลซีนไว้ด้านใน (แกน) ของสายเกลียว เนื่องจากพื้นที่จำกัดและไกลซีนมีขนาดเล็กมากที่สุด และส่งผลให้คอลลาเจนไม่ยืด ส่วนวงแหวนของโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน จะชี้ออกจากสายเกลียว กรดอะมิโนทั้งสองนี้ช่วยให้หน่วยย่อยโทรโพคอลลาเจนเสถียรต่อความร้อน [12] พบว่าคอลลาเจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม ซึ่งใช้คอลลาเจนเป็น carrier สำหรับการขนส่งยา (drug delivery) ช่วยเสริมสร้างและซ่อมแซมกระดูก [18] ผ้าปิดแผล [8] เนื่องจากสมบัติการอุ้มน้ำที่ดีของคอลลาเจน จึงนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางโดยใช้เป็น moisturizing ในการรักษาความชุ่มชื้น [17] คอลลาเจนที่ถูกความร้อนจะมีสมบัติเป็นเจลาติน จึงนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และการห่อหุ้มผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อ (ไส้กรอก ไส้กรอกอิตาเลี่ยน snack stick) [15] นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมกาว อุตสาหกรรมเครื่องหนังและฟิล์ม [6] ในอดีตใช้คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังหมูและวัว ซึ่งเป็นแหล่งการระบาดของโรค bovine spongiform encephalopathy (BSE) ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นในวัว และยังส่งผลต่อคนที่รับประทานเนื้อวัวที่มีการติดเชื้อ ส่งผลให้คนเป็นโรค Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) [2] ดังนั้นจึงควรหาคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ เพื่อทดแทนคอลลาเจนจากสัตว์บก

ปัจจุบันมีการสกัดคอลลาเจนจากสัตว์น้ำหลายชนิด ทั้งในปลา หอย กุ้ง ปู และในปลิงทะเล เช่น คอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซินจากปลิงทะเลชนิด *Cucumaria frondosa* ในประเทศอเมริกา [19] ปลิงทะเลชนิด *Stichopus japonicus* ในประเทศจีน [5] ปลิงทะเลชนิด *Bohadschia* spp. ในประเทศมาเลเซีย [16] และปลิงทะเลชนิด *Holothuria parva* ในประเทศอิหร่าน [4] ซึ่งปลิงทะเลมีคุณค่าทางอาหาร มีสมบัติเป็นยา เป็นยาชูกำลังดั้งเดิมของประเทศจีนและญี่ปุ่น [5] ดังนั้นปลิงทะเลดำในประเทศไทย จึงเป็นแหล่งทางเลือกใหม่ในการสกัดคอลลาเจน ซึ่งพบได้ทั่วไปตามหาดทราย หรือหาดโคลนปนทราย การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการนำผนังลำตัวปลิงทะเลดำมาใช้ในการสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซิน และศึกษาบางสมบัติของคอลลาเจนที่สกัดได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 เก็บตัวอย่าง

โดยเก็บรวบรวมปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) จากธรรมชาติในทะเลอันดามันบริเวณเกาะปู อำเภอเหนือคลอง จังหวัดกระบี่ ห่างจากฝั่งประมาณ 10-15 กิโลเมตร น้ำลึกประมาณ 1-2 เมตร คัดเลือกเฉพาะปลิงทะเลที่ผนังลำตัวไม่มีบาดแผล

2.2 การสกัดคอลลาเจน

2.2.1 การเตรียม crude collagen fibril

กระบวนการทั้งหมดเตรียมที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส โดยนำปลิงทะเลดำแยกอวัยวะภายในออก รวมทั้งเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อภายในออกด้วยคีมคีบ จากนั้นตัดผนังลำตัวเป็นชิ้นเล็ก ๆ และล้างกับน้ำกลั่น ชั่งปลิงทะเล 100 กรัม (น้ำหนักเปียก) กวนผสมกับน้ำกลั่น 1 ลิตร นาน 30 นาที ทำซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นแทนที่น้ำกลั่นด้วย กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติก เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0 และกวนผสมข้ามคืน จากนั้นเทของเหลวออก ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร กวนผสมช้า ๆ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จากนั้นใส่น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร กวนผสมนาน 2 วัน และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 9,000 xg นาน 5 นาที เก็บรวบรวมสารละลายส่วนใสไว้เป็น collagen fibril และส่วนที่เป็นตะกอนกวนผสมอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 9,000 xg นาน 5 นาที เก็บรวบรวมสารละลายส่วนใส นำสารละลายส่วนใสทั้งหมดที่ได้หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 30 นาที จะได้เส้นใยคอลลาเจนอย่างหยาบ ซึ่งเป็นส่วนที่ตกตะกอน จากนั้นนำเส้นใยคอลลาเจนอย่างหยาบ ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง [5]

2.2.2 การสกัด pepsin-solubilized collagen (PSC)

นำคอลลาเจนอย่างหยาบที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมากวนผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (20 v/w) นาน 3 วัน เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกไป และกำจัดเอนไซม์โปรติเอสในคอลลาเจนออกไป [14] ส่วนที่เหลือหลังจากสกัดจะล้างด้วยน้ำกลั่น และกวนผสมกับกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (10 v/w) และใส่ porcine pepsin ในอัตราส่วน enzyme/substrate 1 : 100 (w/w) ย่อยนาน 2 วัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 xg นาน 60 นาที รวบรวมส่วนที่เป็นสารละลายส่วนใส ซึ่งเป็น PSC นำมาแยกเกลือออกโดยเติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 โมลาร์ จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ โดยละลายในกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เพื่อให้ตกตะกอนเร็วขึ้น และล้างหลาย ๆ ครั้ง ด้วยไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (pH 8.0) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เพื่อไม่ให้มีเปปซิน จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ และรวบรวมตะกอน จากนั้นล้างด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และล้างอีกครั้งด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ นาน 2 วัน จากนั้นทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง [5]

2.3 การตรวจสอบขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำ PSC มาทำ SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli [7] เพื่อวิเคราะห์หามวลโมเลกุลและแยกหน่วยย่อยของคอลลาเจน โดยใช้ 7.5 % resolving gel และ 4 % stacking gel เมื่อรันเจลเสร็จจะย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 แล้วเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานจากบริษัท Promega

2.4 ตรวจสอบการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่สกัดได้

นำ PSC 0.01 กรัม มาละลายในกรดอะซีติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร และวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV Spectrophotometer ช่วงความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร

2.5 การวิเคราะห์กรดอะมิโนจากคอลลาเจนที่สกัดได้

นำ PSC มาทำให้ละลายในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งการจำแนกกรดอะมิโนแต่ละชนิดหาได้จากการเปรียบเทียบ retention time

กับ authentic standards

2.6 ทดสอบสมบัติทางกายภาพโดยศึกษาอุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนที่สกัดได้เสียสภาพ

นำ PSC มาละลายในกรดอะซีติก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย 1 : 40 (w/v) และใช้ differential scanning calorimeter วิเคราะห์อุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพ ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วง 10-70 องศาเซลเซียส ที่ 5 K/นาที และบันทึกการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

2.7 ทดสอบความสามารถในการละลาย

ใช้วิธีการของ Montero และคณะ (1991) โดยทดสอบที่ระดับ pH 1-10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมลาร์ และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 6 โมลาร์ และตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี Biuret method โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การสกัดคอลลาเจนที่ละลายด้วยเอนไซม์เปปซิน

สกัด PSC จากปลิงทะเลดำได้ร้อยละ 66.46 จากการสกัดต่อจาก crude collagen fibril ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่น มีสีน้ำตาลเข้ม สอดคล้องกับปลิงทะเลชนิด *Bohadshia* spp. ที่สกัด PSC ได้ร้อยละ 65 [16] ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิดต่าง ๆ

ชนิดสัตว์น้ำ	ปริมาณ PSC (% yield)	อ้างอิง
ผนังลำตัวปลิงทะเล *Stichopus japonicus*	26.6	[13]
ผนังลำตัวปลิงทะเล *Bohadshia* spp.	65	[16]
ผนังลำตัวปลิงทะเล *Holothuria parva*	7	[4]
ผนังลำตัวปลิงทะเลดำ *Holothuria leucospilota*	66.46	การศึกษาครั้งนี้

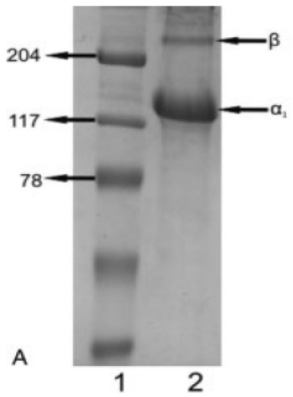
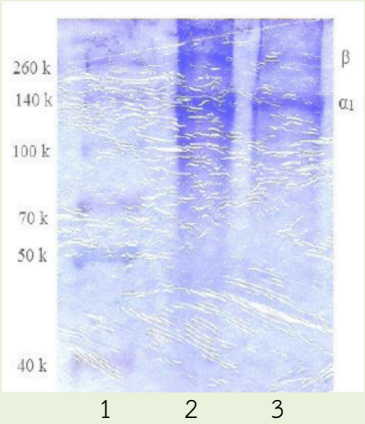
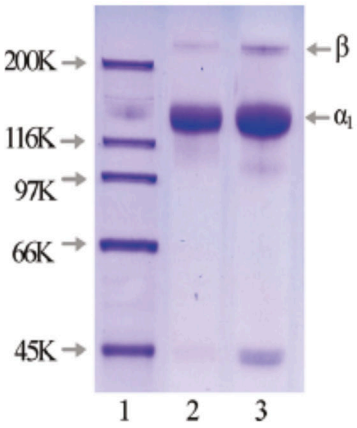
3.2 ขนาดโมเลกุลของคอลลาเจน

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อศึกษาขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนที่สกัดได้จากปลิงทะเลดำในเลนที่ 3 และ 4 ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าเป็นคอลลาเจน type I ที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ α_1 มีมวลโมเลกุลประมาณ 150 กิโลดาลตัน ซึ่งแตกต่างจากคอลลาเจน type I จากปลาคาร์ฟในlane ที่ 2 (รูปที่ 1) พบว่าขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำ ใกล้เคียงกับคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิด *Bohadschia* spp. และ *Parastichopus californicus* ที่มีขนาดโมเลกุลของคอลลาเจน 138 กิโลดาลตัน [10,16]

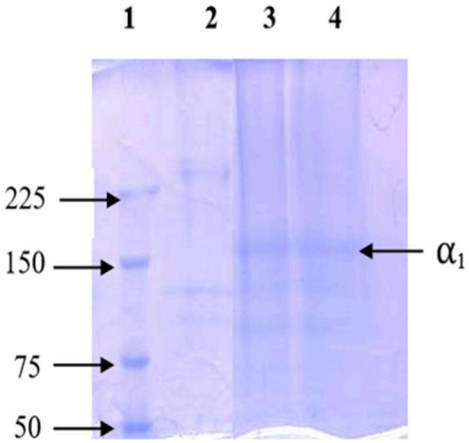
3.3 การดูดกลืนแสงของคอลลาเจน

การวัดการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำในช่วงความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร พบว่าสามารถดูดกลืนแสงยูวีสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2 เนื่องจากคอลลาเจนมีปริมาณของกรดอะมิโนชนิดฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน และไทโรซีนปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิด *Stichopus japonicus* ในการวิจัยของ Cui และคณะ [5] ที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร จากสมบัติการดูดกลืนแสงยูวีนี้สามารถใช้แยกคอลลาเจนออกจากโปรตีนชนิดอื่นได้ โดยโปรตีนชนิดอื่นส่วนใหญ่ดูดกลืน

ตารางที่ 2 ขนาดโมเลกุล (kDa) ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลชนิดต่าง ๆ

ชนิดปลิงทะเล	ภาพ SDS-PAGE*	ชนิดคอลลาเจน	ขนาดโมเลกุลของคอลลาเจน (kDa)	อ้างอิง
Stichopus vastus		type I	122	[3]
Bohadschia spp.		type I	138	[16]
Parastichopus californicus		type I	138	[10]

*Lane 1 คือ สารละลายโปรตีนมาตรฐาน, Lane 2-3 คือ โปรตีนคอลลาเจนจาก *Stichopus* vastus, *Bohadschia* spp. และ *Parastichopus californicus* ตามลำดับ

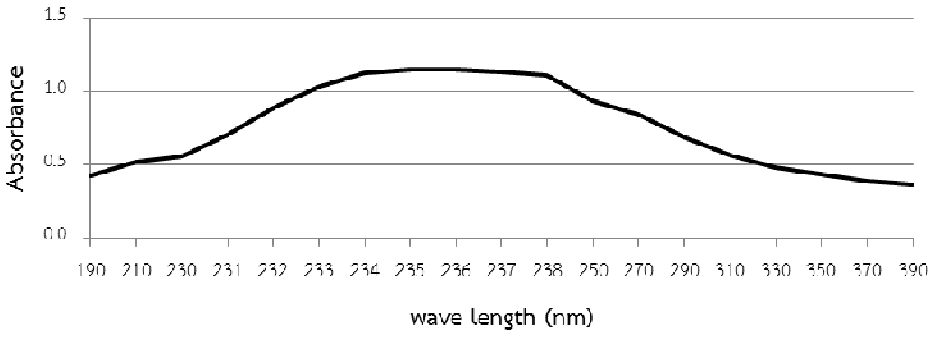


รูปที่ 1 SDS-PAGE ของโปรตีนมาตรฐานและสารละลายคอลลาเจน : lane ที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน, lane ที่ 2 คือ สารละลายคอลลาเจน type I จากปลาคาร์ฟ, lane ที่ 3 และ 4 คือ สารละลายคอลลาเจนปลิงทะเลดำ

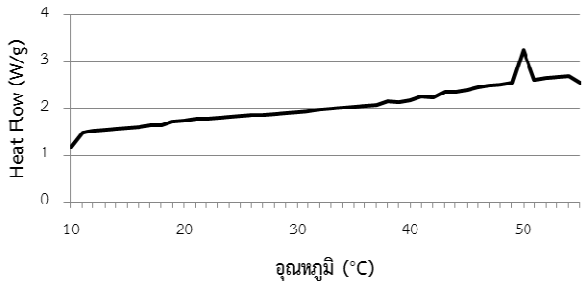
แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

3.4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจน

การวิเคราะห์กรดอะมิโนจากคอลลาเจนของปลิงทะเลดำ พบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบปริมาณมากที่สุด คือ ไกลซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุด จึงมีบทบาทเด่นในโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใย และกรดอะมิโนที่มักพบในคอลลาเจน คือ โปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีน ซึ่งช่วยให้คอลลาเจนเสถียรต่อความร้อน พบว่าคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำมีปริมาณโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนรวมกัน 158 ส่วนใน 1,000 ส่วน (88+70) ซึ่งมีค่าเท่ากับคอลลาเจนจาก *Holothuria parva* 158 ส่วนใน 1,000 ส่วน (96+62) [4] และใกล้เคียงกับคอลลาเจนจากปลิงทะเล *S. japonicus* (161 ส่วนใน 1,000 ส่วน, 95+66) [5] แต่มีปริมาณน้อยกว่าคอลลาเจนจากหนังปลา ดังแสดงในตารางที่ 3



รูปที่ 2 UV spectrum ของ pepsin-solubilize collagen จากปลิงทะเลดำ



รูปที่ 3 DSC thermogram ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำ

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ (ส่วนใน 1,000 ส่วน)

กรดอะมิโน	*H. leucospilota*	*H. parva*	*S. japonicus*	หนังปลาคาร์ฟ	หนังปลาสลาด
Aspartic acid	67.31±1.93	50	59.5±1.5	45	46±0
Threonine	35.44±0.94	-	34.3±1.0	18	26±0
Serine	24.50±0.64	20	44.6±1.2	39	37±0
Glutamic acid	111.73±3.28	74	103.9±2.5	75	85±0
Glycine	202.80±6.17	270	328.7±5.0	330	337±1
Alanine	80.44±2.35	91	110.6±4.5	119	116±0
Valine	18.74±0.44	18	24.3±0.5	21	18±0
Cysteine	0±0	-	-	-	0±0
Methionine	5.95±0.57	5	9.0±0.5	6	12±0
Isoleucine	10.78±0.21	4	18.4±1.0	11	10±0
Leucine	19.41±0.95	16	18.6±0.5	23	22±0
Tyrosine	8.73±0.97	4	8.2±0.2	3	4±0
Phenylalanine	9.77±0.71	6	7.4±0.2	3	15±0
Lysine	8.28±0.35	7	5.0±0.2	26	27±0
Histidine	4.67±0.33	0	3.0±0.1	5	5±0
Arginine	70.61±2.15	49	53.2±3.2	50	52±0
Tryptophan	0.89±0.04	-	-	-	-
Proline	87.85±3.93	96	94.7±4.5	121	113±0
Hydroxyproline	69.86±0.34	62	66.3±4.2	94	75±1
อ้างอิง	การศึกษาครั้งนี้	[4]	[5]	[9]	[1]

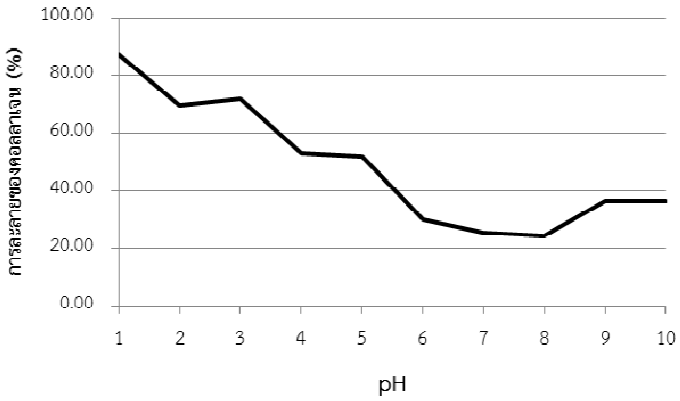
3.5 อุณหภูมิที่ทำให้คอลลาเจนเสียสภาพ

อุณหภูมิในการเสียสภาพของคอลลาเจน (transition temperature, T_{max}) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง differential scanning calorimeter (DSC) ซึ่งสังเกตจาก peak ของกราฟในรูปที่ 3 พบว่าค่า T_{max} ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำเท่ากับ 50.88 องศาเซลเซียส ซึ่งค่า T_{max} ของคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำมีค่าใกล้เคียงกับคอลลาเจนจากปลิงทะเล *H. parva* (46.94 องศาเซลเซียส) [4] แต่แตกต่างกับคอลลาเจนจากปลิงทะเล *S. japonicus* (57.0 องศาเซลเซียส) และคอลลาเจน type I จากปลาคาร์ฟ (62 องศาเซลเซียส) [5] อาจเป็นไปได้ว่าปลิงทะเลดำอยู่ใน genus เดียวกันกับปลิงทะเล *H. parva*

3.6 ความสามารถในการละลายของคอลลาเจน

ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำที่พีเอช 1-10 ดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่าคอลลาเจน ละลายได้ดีที่สุดที่พีเอช 1-5 ซึ่งมีค่าการ

ละลายสูงที่สุดที่พีเอช 1 และค่าการละลายลดลงอย่างชัดเจนในช่วงพีเอช 6-8 และที่พีเอช สูงกว่า 8 มีการละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับคอลลาเจนจากหนังปลาสลาดในการวิจัยของนรินทร์ และวรางคณา [1]



รูปที่ 4 ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำที่ระดับพีเอชแตกต่างกัน

4. สรุป

Pepsin-solubilize collagen (PSC) จากปลิงทะเลดำ (*Holothuria leucospilota*) มีคอลลาเจนร้อยละ 66.46 จากการสกัดต่อจาก crude collagen fibril ซึ่ง PSC ที่สกัดได้สามารถดูดกลืนแสงยูวีสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบปริมาณมากที่สุด คือ ไกลซีน มีปริมาณโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนรวมกันเท่ากับ 158 ส่วนใน 1,000 ส่วน อุณหภูมิในการเสียสภาพของ PSC จากปลิงทะเลดำเท่ากับ 50.88 องศาเซลเซียส และความสามารถในการละลายของ PSC จากปลิงทะเลดำละลายได้ดีที่สุดที่พีเอช 1-5 ซึ่งมีค่าการละลายสูงที่สุดที่พีเอช 1 ดังนั้นคอลลาเจนจากปลิงทะเลดำเป็นแหล่งคอลลาเจนอีกแหล่งหนึ่งที่สามารถใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์ ด้านเภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ฯลฯ ซึ่งเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งแก่ผู้ผลิต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ประจำปี 2558 ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ นางสาวสุไวบ๊ะ สิลสาวรีย์ นางสาวสุปรีดา ด้วงมาก นางสาวปวิชญา พงศ์พิริยะปัญญา และนายอิบรอฮีม หมัดอะดัม ที่มีส่วนช่วยเหลือในงานทดลองครั้งนี้ให้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี

6. รายการอ้างอิง

[1] นรินทร์ ทาหอม และวรางคณา สมพงศ์, 2558, สมบัติของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดจากหนังปลาสลาด, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(2): 257-267.

[2] นริศ เจนวิริยะ, 2544, โรควัวบ้าเกิดจากสารโปรตีน, น.ใกล้หมอ 25(4): 74-75.

[3] Abedin, M.Z., Karim, A.A., Ahmed, F., Latiff, A.A., Gan, C.Y., Ghazali, F.C. and Sarker, M.Z.I., 2012. Isolation and characterization of pepsin-solubilized collagen from the integument of sea cucumber (*Stichopus*

vastus), J. Sci. Food Agric. 93: 1083-1088.

[4] Adibzadeh, N., Aminzadeh, S., Jamili, S., Karkhane, A.A. and Farrokhi, N., 2014, Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin of sea cucumber *Holothuria parva*, Appl. Biochem. Biotechnol. 173: 143-154.

[5] Cui, F., Xue, C., Li, Z., Zhang, Y., Dong, P., Fu, X. and Gao, X., 2007, Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*, Food Chem. 100: 1120-1125.

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

[7] Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227: 680-685.

[8] Li, G.Y., Fukunaga, S., Takenouchi, K. and Nakamura, F., 2005, Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials, Int. J. Cosmet. Sci. 27: 101-106.

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

[10] Liu, Z., Oliveira, A.C.M. and Su, Y.C., 2010, Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*), J. Agric. Food Chem. 58: 1270-1274.

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

[12] Myllyharju, J., 2005, Intracellular post-translational modifications of collagens, Curr. Top. Med. 247: 115-147.

[13] Park, S.Y., Lim, H.K., Lee, S., Hwang, H.C., Cho, S.K. and Cho, M., 2012, Pepsin-solubilised collagen (PSC) from Red Sea cucumber (*Stichopus japonicus*) regulates cell cycle and the fibronectin synthesis in HaCaT cell migration, Food Chem. 32: 487-492.

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

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

[16] Siddiqui, Y. D., Arief, E.M., Yusoff, A., Suzina A.H. and Abdullah, S.Y., 2013, Isolation of pepsin-solubilized collagen (PSC) from crude collagen extracted from body wall

of sea cucumber (*Bohadschia* spp), Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 5: 555-559.

[17] Swatschek, D., Schatton, W., Kellermann, J., Muller, W.E.G. and Kreuter, J., 2002, Marine sponge collagen: Isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum, Eur. J. Pharmaceut. Biopharm. 53: 107-113.

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

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