

การเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวาย
เป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

Adding Value to Collagen from Fish Scale of Nile Tilapia and Skin of Striped
Catfish as Part of a Cosmeceutical Product

พัชรพงษ์ พานิช¹ เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน¹ มธุรส ชัยหาญ² และดวงพร อมรเลิศพิศาล^{1*}

Phanich, P.¹ Mangumphan, K.¹ Chaihar, M.² and Amornlerdpison, D^{1*}

¹ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹ Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University Chiangmai 50290

² คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

² Faculty of Science, Maejo University Chiangmai 50290

*Corresponding author: dounpornfishtech@gmail.com

บทคัดย่อ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) เป็นปลาน้ำจืดที่ได้รับความนิยมในการบริโภค และพบมีผลพลอยได้ที่เหลือเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะส่วนเหลือบริเวณหนังที่สามารถนำไปเพิ่มมูลค่าโดยสกัดเป็นคอลลาเจนได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงประเมินร้อยละของผลผลิตคอลลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวาย แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ชีวภาพที่สนับสนุนการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ผลจากการศึกษาพบว่า ผลผลิตคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายเท่ากับ $21.67 \pm 2.19\%$ และ $17.00 \pm 1.15\%$ ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของคอลลาเจนที่สกัดได้กับคอลลาเจนในท้องตลาด พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่าสูงที่สุดพบในคอลลาเจนในท้องตลาด (0.0706 ± 0.0001 mg of Trolox) ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ช่วยป้องกันการเพิ่มเม็ดสีผิว พบว่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลมีฤทธิ์การยับยั้งสูงที่สุด (0.0713 ± 0.0010 g of Kojic acid) นอกจากนี้ในส่วนต้นทุนการผลิต คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลมีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด จึงได้นำคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลไปพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์เวชสำอางบำรุงผิวหน้า และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่งที่อุณหภูมิ 4°C และ 45°C สลับกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 6 รอบ พบว่า มีความหนืดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ลักษณะสีของครีม ค่าพีเอช และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไม่เปลี่ยนแปลง และเมื่อนำไปทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัครจำนวน 30 คน พบว่า อาสาสมัครมีความพึงพอใจโดยรวมอยู่ในระดับดีมาก และมีความต้องการซื้อผลิตภัณฑ์สูงเมื่อมีการวางจำหน่ายในท้องตลาด

คำสำคัญ: เกล็ดปลานิล หนังปลาสวาย คอลลาเจน ฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

Abstract

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) are freshwater fish which are becoming increasingly popular in the food industry. Following processing there are many left over by-products, particularly the left over skin. These byproducts can add value particularly by the production of fish collagen. This study was performed to evaluate the percentage yield of collagen from Nile tilapia scale and Striped catfish skin, and then to analyze the biological properties which could possibly support the development of cosmeceutical products. The results showed that the percentage yield of collagen from the Nile tilapia and Striped catfish skin were $21.67 \pm 2.19\%$ and $17.00 \pm 1.15\%$ respectively. The analyses of biological activity, comparing three collagen samples, from both types of fish and a commercial preparation, showed that the commercial collagen had the highest effect on antioxidant activity (0.0706 ± 0.0001 mg of Trolox), whereas collagen from the Nile tilapia scale had the highest anti-tyrosinase activity, measured by its effect on anti-hyperpigment (0.0713 ± 0.0010 mg of Kojic acid). In addition to the production cost of the Nile tilapia scale was the cheapest. A cosmeceutical product, a face serum, has been developed using collagen extracted from Nile tilapia scale. The stability of the preparation was tested by subjecting samples to heating-cooling cycles, at 45°C and 4°C , at intervals of 24 hours over 6 cycles. The pH, colour and texture of the product remained unchanged but there was a slight increase in viscosity. Product satisfaction was estimated using 30 volunteers. Overall the results showed satisfaction levels to be very high, with a high probability of product demand if it becomes commercially available.

Keywords: Nile tilapia scale, Striped catfish skin, collagen, cosmeceutical products

บทนำ

สัตว์น้ำถือเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตคอลลาเจน เนื่องจากอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปสัตว์น้ำทำให้มีเศษเหลือจากกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ตามมา (Morrissey *et al.*, 2000) โดยเฉพาะเกล็ดปลาและหนังปลา มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ปลานิลและปลาสวายเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมาจนถึงปัจจุบัน โดยรายงานของสถิติการประมงล่าสุด ปลานิลและปลาสวายมีปริมาณการจับรวมกัน (รวมเพาะเลี้ยง) ประมาณ 238 ตัน คิดเป็นมูลค่า 11,841 ล้านบาท หรือ 33.88% ของมูลค่าสัตว์น้ำจืดทั้งหมดของประเทศไทย (Fisheries, 2016) จากการแล่ ขำแหละ และแปรรูปเพื่อการส่งออกปลาของไทย ทำให้มีเศษเหลือจากกระบวนการเหล่านี้ เช่น ส่วนหัว ครีบ ลำไส้ ก้าง เกล็ดปลาและหนัง ที่ควรนำไปแปรรูปเพิ่มมูลค่าเป็นคอลลาเจนได้ เนื่องจากคอลลาเจนสามารถพบได้ทั้งในผิวหนัง เอ็น และกระดูกของสิ่งมีชีวิต โดยเป็นโปรตีนที่มีมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ประมาณ 30% และมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรม และมีการนำมาเป็นส่วนประกอบในอาหารเสริมสุขภาพและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Ikoma *et al.*, 2003)

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลพบว่าให้ปริมาณผลผลิต 22 – 29% (Qiang *et al.*, 2015) การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระบอกดำ (*Liza subviridis*) ให้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนเท่ากับ 0.89% (Kutako *et al.*, 2015) นอกจากนี้คอลลาเจนที่สกัดได้จากส่วนของหนังปลานิลให้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจน 39.23% (Inthuserdha and Chiradetprapai, 2015) ส่วนคอลลาเจนจากหนังปลาสดได้ผลผลิต 38.25% (Thahom and Sompongse, 2016) ทั้งนี้ปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนที่สกัดได้มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดปลา กระบวนการสกัด และองค์ประกอบหรือส่วนที่นำมาสกัด เป็นต้น

คอลลาเจนที่สกัดได้จากสัตว์น้ำมีข้อจำกัดของการเสื่อมสภาพจากความร้อนได้มากกว่าสัตว์บก ทั้งนี้เนื่องจากมีโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีต่างกัน โดยเฉพาะกรดอะมิโนชนิดโพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีนที่ต่ำกว่าสัตว์บก (Gauza-Wlodarczyk *et al.*, 2017) มีการนำคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลานิลสดความเข้มข้น 1% มาพัฒนาในตำรับครีมบำรุงผิวพบว่ามีผลคงตัวทางกายภาพดี แต่ยังไม่มีการประเมินประสิทธิภาพและความพึงพอใจในอาสาสมัคร (Potaros *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามพบว่าคอลลาเจนที่มีจำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่นซึ่งเป็นคอลลาเจนที่สกัดมาจากเกล็ดและหนังปลา

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตและฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังของ คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสด และเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางบำรุงผิวหน้าที่มีมูลค่าสูงพร้อมกับประเมินความพึงพอใจในอาสาสมัคร

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

จัดหาหนังปลาสดและเกล็ดปลานิล จากฐานเรียนรู้ปลาบึกเชิงบูรณาการ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ นำมาล้างทำความสะอาด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (°C) เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการทดลอง

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาและหนังปลา

นำเกล็ดปลานิลและหนังปลาสดมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (AOAC, 2000) ดังนี้ วิเคราะห์ความชื้นโดยใช้วิธีการทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 105°C วิเคราะห์โปรตีนโดยการนำไปย่อยในกรดเข้มข้นต่อด้วยการกลั่น และขั้นตอนสุดท้ายนำไปไทเทรต จากนั้นจึงนำค่าที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์ crude protein วิเคราะห์ไขมันโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายไขมัน organic โดยใช้ hexane จากนั้นนำไปสกัดโดยใช้อุปกรณ์ Soxhlet extract เมื่อสกัดไขมันเสร็จสิ้นแล้วนำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน และวิเคราะห์เถ้าโดยการหาปริมาณสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร โดยใช้ความร้อนเผาผลาญสารอินทรีย์ หลังจากนั้นนำเถ้าที่ได้ไปชั่งน้ำหนักและคำนวณปริมาณเถ้า

การสกัดคอลลาเจน

กำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและเม็ดสีออกจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสด ดัดแปลงวิธีจาก Pipatcharoenwong (2008) ดังนี้ แช่หนังปลาสดในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ด้วยอัตราส่วนเกล็ดปลานิลและหนังปลาสดต่อสารละลาย NaOH เท่ากับ 1:5 โดยทำการกวนตลอดและเปลี่ยน

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นประจำทุก 2 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างเกลือปลาและหนังปลาด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 จึงนำไปสกัดคอลลาเจน ตามวิธีดัดแปลง Thahom and Sompongse (2016) โดยแช่ด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำให้พีเอชเป็นกลาง ต่อด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วย NaCl และทำให้พีเอชเป็นกลาง สุดท้ายทำแห้งโดยวิธี Freeze dyer จากนั้นคำนวณหาปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนที่สกัดได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณผลผลิตของคอลลาเจน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนหลังจากการทำแห้ง (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักหนังหรือเกล็ดปลาผ่านการกำจัดโปรตีน (กรัม)}}$$

ทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตคอลลาเจนที่สกัดได้กับคอลลาเจนจากท้องตลาดซึ่งนำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น และวิเคราะห์ปริมาณของคอลลาเจนจากปริมาณ hydroxyl proline ที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่ โดยวิธีการ AOAC official method 990.26 (2000) ด้วย GC-MS with factor 8.0

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

โดยวิธี disc diffusion Inhibition ด้วยการวัดค่าบริเวณใส (clear zone) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยซึ่งคอลลาเจนผงมาละลายกับน้ำกลั่น ใช้ paper disc จุ่มสารละลายคอลลาเจน แล้วนำมาทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes*) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาอ่านผลมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดคอลลาเจนในการยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration : MIC)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสดและคอลลาเจนในท้องตลาด โดยใช้วิธีทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ ABTS scavenging activity ตามวิธีการของ Re *et al.* (1999) ดังนี้ ผสมน้ำ ยา ABTS ลงในหลอดที่มีสารทดสอบ ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาทีวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร วัดจำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของ Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีโดยแสดงผลเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ต่อปริมาณสารสกัด 1 กรัม แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{734} \text{ control} - A_{734} \text{ test sample}) / A_{734} \text{ control}] \times 100$$

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Pomerantz (1963) ดังนี้ เตรียม 1-tyrosine substrate โดยมี 25 ไมโครลิตร (ul) ของ 0.5 mM L-DOPA, 25 ul ของ 10 mM 1-tyrosine, 875 ul ของ 50 mM ของ phosphate buffer (pH 6.5) และ 25 ul ของสารสกัดที่จะทดสอบที่ยังไม่เติมเอนไซม์ลงไป เตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน 96-well microplate ผสมสารสกัดและสารละลายให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C และเติม 50 ul ของ mushroom tyrosinase (1600 u/ml) บ่มต่ออีก 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นเปอร์เซ็นต์ และใช้ kojic acid เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบฤทธิ์คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อย กับคอลลาเจนในห้องทดลอง

การเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า

นำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปพัฒนาตำรับเครื่องสำอาง โดยตั้งตำรับครีมเบสที่มีส่วนประกอบของ carbopol, cetyl alcohol, glycerine, butylene glycol, polysorbate 20, ethylene diamine tetra acetic acid และ triethanolamine เป็นสูตรพื้นฐาน เตรียมซึ่งสารทั้งในส่วนของ oil phase และ water phase ตามตำรับเป็นสูตรมาตรฐาน และสูตรทดสอบเติมสารสกัดคอลลาเจนลงไป ที่ความเข้มข้น 1% ผสมส่วนประกอบใน oil phase ให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C และผสมส่วนประกอบใน water phase ที่อุณหภูมิ 70°C เมื่อส่วนผสมของทั้ง 2 phase ละลายเข้ากันดีแล้ว เทส่วนผสม water phase ลงในส่วนผสม oil phase คนตลอดเวลาให้เนื้อครีมกระจายเข้ากันประมาณ 10 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นและบรรจุใส่ภาชนะ ทำการศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ตามวิธีการของ Chantree (2015) โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพจากสี ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ 3 สภาวะคือ ที่อุณหภูมิ 4°C, 45°C และอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 วัน และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่งโดยเก็บไว้ที่ความร้อนสลับเย็น (heating-cooling cycle) จำนวน 6 รอบ ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสลับกับที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1 รอบ โดยมีเกณฑ์ประเมินระดับความหนืด (viscosity score) 4 ระดับ ดังนี้ ++++= เนื้อครีมเหนียวข้นมาก (extremely) +++= เนื้อครีมเหนียวมาก (very much) += เนื้อครีมหนืดปานกลาง (medium) += เนื้อครีมหนืดน้อย (slightly)

การทดสอบความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์

ทดสอบความพึงพอใจและการยอมรับหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยใช้แบบสอบถามในอาสาสมัครจำนวน 30 คน แบบสอบถามประกอบด้วย ข้อมูลส่วนตัว ความคิดเห็น ความตั้งใจซื้อ ความพึงพอใจ และการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ โดยมีเกณฑ์ระดับความพึงพอใจ 5 ระดับ ดังนี้ 1 = ไม่ชอบ (dislike), 2 = ชอบน้อย (slight), 3 = ชอบปานกลาง (moderate), 4 = ชอบมาก (good) และ 5 = ชอบมากที่สุด (excellent) และแสดงความพึงพอใจในแต่ละระดับเป็นเปอร์เซ็นต์ (%satisfaction) โดยได้ชี้แจงให้อาสาสมัครทราบก่อนการทดสอบว่า หากมีอาการแพ้เช่น อาการแดง (erythema) และอาการบวม (edema) ให้หยุดใช้ทันที

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทดสอบค่าความแตกต่างของฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนังปลาชววยและคอลลาเจนจากในท้องตลาด โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี Independent Samples T-Test ในการทดสอบองค์ประกอบทางเคมี และ ANOVA ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากนั้นนำไปทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range Test แสดงผลการทดลองในรูปแบบของค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

องค์ประกอบทางเคมี

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลานิลและหนังปลาชววย พบว่ามีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ดังแสดงใน Table 1 จะเห็นว่าองค์ประกอบหลักของเกล็ดปลานิลคือ โปรตีน และเถ้า ส่วนหนังปลาชววยองค์ประกอบหลักคือ โปรตีน และไขมัน โดยเกล็ดปลานิลจะมีปริมาณโปรตีน และปริมาณเถ้ามากกว่าหนังปลาชววย แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วนหนังปลาชววยจะมีไขมันมากกว่าเกล็ดปลานิล ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า องค์ประกอบทางเคมีเป็นโปรตีนมีค่ามากที่สุดคือ 48.27 และ 41.56 ในเกล็ดปลานิลและหนังปลาชววยตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pipatcharoenwong (2008) และ Thahom and Sompongse (2015) ที่พบว่า องค์ประกอบหลักทางเคมีของเกล็ดปลานิลและหนังปลาชววย คือ โปรตีนซึ่งมีค่าเท่ากับ 60.01%, 34.19% ตามลำดับ โดยปริมาณของโปรตีนที่ได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอวัยวะหรือส่วนที่นำมาวิเคราะห์ สายพันธุ์ และอาหารที่ปลาได้รับ

ปริมาณร้อยละของผลผลิตคอลลาเจน

จากการทดลองพบว่า ปริมาณร้อยละของผลผลิตคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลมีปริมาณสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาชววย เนื่องจากการวิเคราะห์ประกอบทางเคมีพบว่า ในเกล็ดปลานิลมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าหนังปลาชววย แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลแสดงใน Table 2 ซึ่งคอลลาเจนคือโปรตีนชนิดหนึ่งที่เกิดจากการเรียงตัวกันของกรดอะมิโนด้วยพันธะเปปไทด์ แสดงปริมาณคอลลาเจนและจากการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน ด้วยการคำนวณจากร้อยละของกรดอะมิโน hydroxyproline พบว่าคอลลาเจนที่สกัดมาจากเกล็ดปลานิลมีปริมาณสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาชววย ดังแสดงใน Table 3 ทั้งนี้ปริมาณคอลลาเจนจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ เนื้อเยื่อ และอายุของสัตว์ (Friess, 1998) รวมทั้งวิธีการสกัดด้วย

Table 1 Chemical composition of scale Nile tilapia and skin Striped catfish

Chemical composition	% dry weight	
	Scale Nile tilapia	Skin Striped catfish
Moisture	21.29±0.57 ^a	19.70±0.14 ^a
Protein	48.27±0.15 ^a	41.56±1.26 ^a
Fat	0.037±0.015 ^a	25.83±0.79 ^b
Ash	30.40±0.93 ^a	12.90±0.81 ^a

Data expressed as mean ± SD (n=3)

a, b, c Means with different superscript in same row are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2 Percent yield of collagen from scale Nile tilapia and skin Striped catfish

Samples	% yield collagen (g)
Scale Nile tilapia	21.67±2.19
Skin Striped catfish	17.00±1.15

* Data expressed as mean ± SD (n=3)

Table 3 Percent hydroxyproline of collagen from scale Nile tilapia and skin Striped catfish

Samples	Hydroxyproline of collagen (g/100)
Scale Nile tilapia	20.971
Skin Striped catfish	14.105

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อยและคอลลาเจนจากในท้องตลาด พบว่า คอลลาเจนจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อยและคอลลาเจนในท้องตลาดไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes* ทั้ง 3 ชนิดได้ จากการรายงานของ Wieprecht *et al.* (1997) พบว่า คอลลาเจนสามารถต้านแบคทีเรียที่เกิดจากกรดอะมิโนที่ชอบน้ำจะปล่อยเปปไทด์เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่เป็นประจุบวก แล้วเกิดปฏิกิริยากับเปปไทด์ที่อยู่บนพื้นผิวแบคทีเรียที่เป็นประจุลบ และยังขึ้นอยู่กับความแตกต่างที่มีอยู่บนองค์ประกอบเบรนนทำให้มีผลต่อการยับยั้งและความจำเพาะต่อสารต้านเชื้อแบคทีเรีย (Floris *et al.*, 2003) นอกจากนี้ Patrzykat and Douglas (2005) พบว่า ความเข้มข้นของเปปไทด์ในคอลลาเจนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมีผลต่อความสามารถในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและเยื่อหุ้มนิวเคลียสของแบคทีเรีย ดังนั้นจากการทดสอบคอลลาเจนทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้นั้น อาจเนื่องมาจากในกระบวนการสกัดทำให้เปปไทด์สำคัญในการต้านเชื้อแบคทีเรียสูญเสียไปหรือมีปริมาณน้อยเกินไปที่จะต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Inhibition) ของคอลลาเจนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด พบว่าปริมาณความเข้มข้นที่ 25 – 50 mg/ml คอลลาเจนที่จำหน่ายในท้องตลาดสกัดจากปลาทะเล มี % Inhibition ระหว่าง 93.74 – 98.87% ส่วนคอลลาเจนที่สกัดมาจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายที่ความเข้มข้น 25 – 100 mg/ml ให้ % Inhibition ระหว่าง 34.06 – 51.30% และ 8.01 – 25.31% ตามลำดับ แสดงผลการทดลองใน Figure 1 โดย คอลลาเจนจากในท้องตลาด มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับวิตามินอีหรือ trolox มากที่สุด รองลงมาคือ คอลลาเจนที่มาจากเกล็ดปลานิล และคอลลาเจนจากหนังปลาสวาย มีค่าเท่ากับ 0.0706, 0.0374 และ 0.0192 mM (TEAC) ตามลำดับ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ 50% (IC_{50}) โดยค่า IC_{50} ที่มีค่าน้อยหมายถึง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ผลการทดลองพบว่าคอลลาเจนในท้องตลาดดีที่สุดที่สุด เนื่องจากแหล่งที่อยู่อาศัย สายพันธุ์ และอาหารที่ปลาได้รับแตกต่างกัน ซึ่งคอลลาเจนในท้องตลาดสกัดมาจากปลาทะเล ส่วนคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายสกัดมาจากปลาน้ำจืด แสดงผลการทดลองใน Table 4 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Morimura *et al.* (2002) ได้สกัด hydrolysates collagen จากหนัง และกระดูกปลา yellowtail โดยใช้เอนไซม์ hydrolysates พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้มีคุณสมบัติต้านการเกิดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ Zhuang *et al.* (2009a) พบว่าคอลลาเจนเปปไทด์จากแมงกะพรุน (*Rhopilema esculentum*) มีปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระต่อกรดไขมันลิโนเลอิกและ Wang *et al.* (2013) ยังพบว่าคอลลาเจนเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยคอลลาเจนจากเกล็ดปลาจวด (*Pseudosciaena crocea*) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งจะเห็นว่าแหล่งที่มาทั้งหมดของคอลลาเจนมาจากสัตว์น้ำในทะเล

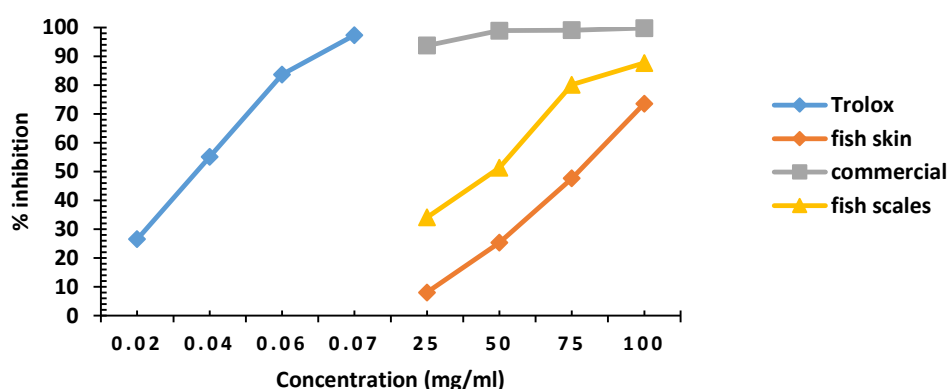


Figure 1 Effect of collagen from three sources and trolox on ABTS scavenging activity

Table 4 Comparison of antioxidant activity of collagen from three sources

Samples	mM TEAC/g extract*	IC ₅₀ (mg/ml)
Scale Nile tilapia	0.0374±0.0015 ^b	48.11
Skin Striped catfish	0.0192±0.0014 ^c	85.68
Commercial	0.0706±0.0001 ^a	24.99

* Data expressed as mean ± SD (n=3)

a, b, c Values with different superscript annotations show significantly different ($p < 0.05$)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อยและคอลลาเจนจากในท้องตลาด ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของคอลลาเจนที่ได้จากแหล่งที่มาแตกต่างกัน 3 ชนิด โดยพบว่าปริมาณความเข้มข้นคอลลาเจนของทั้ง 3 ชนิด ที่ 50 – 100 mg/ml คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลให้ % Inhibition ระหว่าง 8.22 – 24.82%, คอลลาเจนในท้องตลาด ให้ % Inhibition ระหว่าง 12.76 – 21.98% และ คอลลาเจนที่มาจากหนังปลาสร้อย ให้ % Inhibition ระหว่าง 4.38 – 14.40% แสดงผลการทดลองใน Figure 2 และพบว่าคอลลาเจนที่มาจากเกล็ดปลานิล มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเทียบเท่ากับ kojic acid มากที่สุด รองลงมาคือคอลลาเจนที่มาจากในท้องตลาด และคอลลาเจนจากหนังปลาสร้อย มีค่าเท่ากับ 0.0713±0.0010, 0.0673±0.0053 และ 0.0566±0.0034 ตามลำดับ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 50% (IC₅₀) พบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลสูงที่สุด และค่า IC₅₀ ที่มีค่าน้อยหมายถึงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง แสดงผลการทดลองใน Table 5 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลสูงนั้น อาจมาจากความสามารถการไปจับกับโลหะทองแดงซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาสร้อยและในท้องตลาด ตามการรายงานของ Zhuang *et al.* (2009a) พบว่า คอลลาเจนไฮโดรไลเซตที่ได้จากแมงกะพรุนมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส เพราะมีความสามารถไปจับกับโลหะทองแดงซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ และ Abdillah *et al.* (2017) ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลิงทะเล sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) พบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลิงทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase

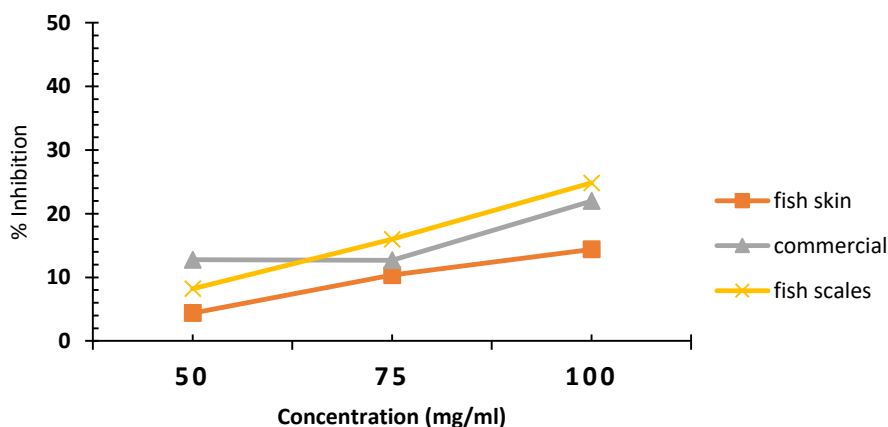


Figure 2 Anti-tyrosinase activity of collagen from three sources

Table 5 Comparison of anti-tyrosinase activity of collagen from three sources

Samples	mg Kojic acid /g extract	IC ₅₀ (mg/ml)
Scale Nile tilapia	0.0713±0.0010 ^a	171.29
Skin Striped catfish	0.0566±0.0034 ^b	318.77
Commercial	0.0673±0.0053 ^a	175.37

* Data shows as mean ± SD (n=3)

a, b, c Values with different superscript annotations show significantly different ($p < 0.05$)

การเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า

จากการนำคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลนำไปพัฒนาตำรับเครื่องสำอาง ได้แก่ เซรั่มบำรุงผิวหน้า และทำการศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ ทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์โดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4°C และที่อุณหภูมิ 45°C เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่า ค่าพีเอช สี และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ยังคงสภาพเดิม แสดงใน table 6 และการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่ง (ร้อนสลับเย็นที่อุณหภูมิ 4°C และ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 6 รอบ) พบว่า ค่าพีเอช สีและเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ยังคงสภาพเหมือนเดิม ไม่มีการแยกชั้น ส่วนความหนืดจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จาก 3.444 Pa.s เปลี่ยนเป็น 3.694 Pa.s ดังแสดงใน table 7 เนื่องจากเนื้อเซรั่มเป็นเนื้อเจล มีส่วนผสมน้ำเป็นหลัก เมื่อเวลาผ่านไปทำให้น้ำระเหยออกบางส่วน ทำให้ความหนืดของเซรั่มเพิ่มขึ้น

ผลการทดสอบความพึงพอใจผลิตภัณฑ์

ผลการทดสอบความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ เซรั่มบำรุงผิวหน้าผสมคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลา นิล ในอาสาสมัครจำนวน 30 ท่าน ทั้งเพศหญิงและเพศชาย ในอายุระหว่าง 20 – 49 ปี พบว่า จากการประเมินโดยรวมของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สี กลิ่น เนื้อของผลิตภัณฑ์ เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ความหนืดของผลิตภัณฑ์ การซึมเข้าสู่ผิว ความพึงพอใจโดยรวมและการตัดสินใจซื้อเมื่อวางจำหน่าย อยู่ในระดับดีมาก 57.50% อยู่ใน ระดับดี 41.67% และระดับปานกลาง 0.82% ดังแสดงใน Figure 3

Table 6 Stability test of cosmetic product at room temperature (RT) and 45 °C for 45 days

Condition	pH	Colour	Texture	Feel on skin	Viscosity score
Control	5.68	White	soft	Soft & smooth	+++
RT	5.69	White	soft	Soft & smooth	+++
4 °C	5.57	White	soft	Soft & smooth	+++
45 °C	5.61	White	soft	Soft & smooth	+++

Viscosity score : +++=Very much, +=Medium, += Slightly

Table 7 Stability test by heating – cooling for 6 cycles

Condition	pH	Colour	Texture	Feel on skin	Viscosity (Pa.s)	Viscosity score
1	5.61	white	soft	Soft & smooth	3.444	+++
2	5.62	white	soft	Soft & smooth	NA	+++
3	5.59	white	soft	Soft & smooth	NA	+++
4	5.60	white	soft	Soft & smooth	NA	+++
5	5.62	white	soft	Soft & smooth	NA	+++
6	5.58	white	soft	Soft & smooth	3.694	+++

NA = Not available, Viscosity score : +++=Very much, +=Medium, += Slightly

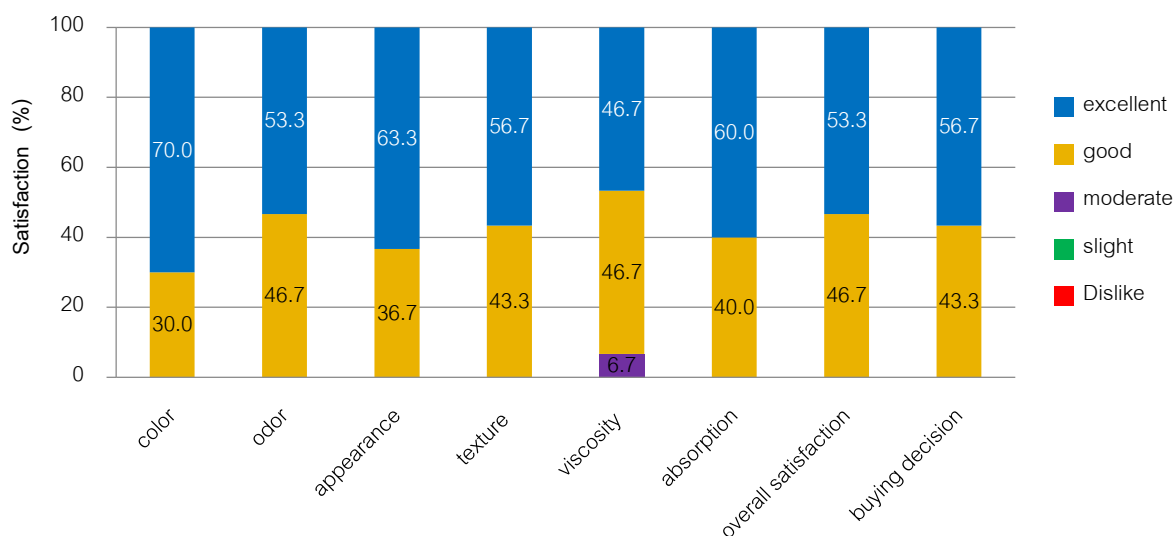


Figure 3 Evaluation of satisfaction of collagen facial serum

สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดคอลลาเจนที่มาจากสัตว์น้ำจืด (เกล็ดปลานิลและหนังปลาสรวย) ให้ผลผลิตคอลลาเจน (yield) เท่ากับ 22% และ 17% และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของคอลลาเจนที่สกัดจากวัตถุดิบแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ เกล็ดปลานิล หนังปลาสรวย และคอลลาเจนในท้องตลาด พบว่า คอลลาเจนในท้องตลาดและคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสรวย ส่วนต้นทุนการผลิต พบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสรวย และเมื่อเลือกคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลนำไปพัฒนาเป็นตำรับผลิตภัณฑ์เวชสำอาง (เซรั่มบำรุงผิวหน้า) ไปทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เมื่อครบระยะเวลาทดสอบพบว่า มีความหนืดเพิ่มขึ้น แต่ลักษณะสีของเซรั่ม ค่าพีเอช เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไม่เกิดเปลี่ยนแปลง เมื่อนำไปทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัคร พบว่า อาสาสมัครมีความพึงพอใจโดยรวมอยู่ในระดับดีมาก และมีความต้องการซื้อผลิตภัณฑ์สูงเมื่อมีการวางจำหน่ายในท้องตลาด

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ได้นำคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางในรูปแบบเซรั่มบำรุงผิวหน้า เพียงผลิตภัณฑ์เดียวเท่านั้น ยังสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้อีก เช่น ครีมบำรุงผิวกาย หรือพัฒนาในรูปแบบแคปซูลสำหรับบริโภคคอลลาเจนโดยตรง และดำเนินการทดสอบทางคลินิกในมนุษย์เพิ่มเติม เพื่อประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนทุนการวิจัยส่วนหนึ่งในการศึกษาครั้งนี้ และฐานเรียนรู้ปลาปักเชิงบูรณาการ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำที่อนุเคราะห์สถานที่ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- Abdillah, S., Wijiyanti, G., Setiawan, M., Umrohnoor, S. and Nurilmala, M. 2017. In vitro anti-tyrosinase and anti-elastase activity of collagen from sea cucumber (*Holothuria leucospilota*). African Journal of Biotechnology. Vol. 16(15): 771-776.
- AOAC. 2000. American society of analytical chemistry and preparation method. 999.10.
- AOAC Official Method 990.26. 2000. Hydroxyproline in meat and meat products. Official methods of analysis of AOAC International. 17th edition. Gaithersburg, MD, Chapter 39.
- Chantree, K. 2015. Formulation of whitening cosmetics from Lakoocha extract. Suan Dusit Rajabhat University Research Journal 8 (1): Jan-April. 24 p. [in Thai]
- Fisheries. 2016. Fisheries statistics of Thailand. Information and communication technology center. Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Floris, R., Recio, I., Berkhout, B., Visser, S. 2003. Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. Current Pharmaceutical Design, 9, 1257-1273.
- Friess, W. 1998. Collagen – biomaterial for drug delivery. Eur. J. Phar. and Biophar 45: 113-136.
- Hammerschmidt, P.A. and Pratt, D.E. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. Journal of Food Science, 43(2): 556 -559.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D. and Mann, S. 2003. Microstructure, mechanical, and biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. J. Struct. Biol. 142: 327– 333.
- Inthuserdha, P., and Chiradetprapai, N. 2016. Extraction of acid-soluble collagen from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skins. Fishery Technological Division, Department of Fisheries. 32 p. [in Thai]
- Kutako, M., Tocharoen, T., Sonthi, M., Hiransuchalert, R. and Watanachote, J. 2016. Yield and protein pattern of collagen extracted from Greenback mullet (*Liza subviridis*) scale by different pepsin concentrations. Khon Kaen AGR. J. 43 SUPPL. 1: 562 – 567. [in Thai]
- Gauza-Włodarczyk, M., Kubisz, L., Mielcarek, S., and Włodarczyk, D. 2017. Comparison of thermal properties of fish collagen and bovine collagen in the temperature range 298–670. Materials Science and Engineering C 80 (2017) 468–471

- Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T. and Kida, K. 2002. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Process Biochemistry* 37: 1403–1412
- Morrissey, M.T., and Park, J.W. 2000. *Surimi and surimi seafood*. Newyork: Marcel Dekker. 127 – 166.
- Pellegrini, N., Pannala, Y. and RiceEvan, C. 1999. Antioxidant activity applying an improve ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 9/10(6):1231-1237.
- Patrzykat, A., and Douglas, S. E. 2005. Antimicrobial peptides: cooperative approaches to protein. *Protein and Peptide Letters*, 12, 19-25.
- Pipatcharoenwong, C. 2008. Fish scale collagen: extraction and partial characterization. Thesis Master of Science. Department of Food Science and Technology, Kasetsart University Bangkok. 131 p. [in Thai]
- Potaros, T., Watthanachaiyingcharoen, R., and Potaros, T. 2011. Preparation and physical stability of Nile tilapia fish skin collagen creams. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal* 2011;6(4): 260-264
- Qiang, Z., Wang, Q., Shun, Lv., Lu, J., Jiang, S., Regenstein, J.M. and Lin, L. 2015. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Bioscience*13: 2041–2048.
- Thahom, N., and Sompongse, W. 2016. Characterisation of acid-soluble collagen from skin of Grey featherback (*Notopterus notopterus*). *Journal of Science and Technology*. 23(2):257–267. [in Thai]
- Wang, B., Wang, YM., Chi, CF., Luo, HY., Deng, SG., and Ma, JY. 2013. Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scale of croceine croker (*Pseudosciaena crocea*). *Marine Drugs*, 11(11) ,4641-4661
- Wieprecht, T., Dathe, M., Epand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., and Maloy, W. L. 1997. Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry*, 36, 12869-12880
- Zhuang, Y., Zhuang, Y., Sun, L., Zhao, X., Wang, J., Hou, H., and Li, B. 2009a. Antioxidant and melanogenesis –inhibitory activities of collagen peptide from jelly fish. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(10), 1722-1727