

ชื่อวิทยานิพนธ์	การใช้เปปซินในการสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากหนังปลาตาหวาน
ผู้เขียน	นายสิทธิพงศ์ นลินานนท์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2549

บทคัดย่อ

เปปซินจากกระเพาะปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ผ่านการสกัดและตกตะกอนแยกส่วนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0-20 ได้ผลผลิตร้อยละ 73.1 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 33.7 เท่า มีพีเอช และอุณหภูมิที่ความเหมาะสมต่อการย่อยสลายซีโมโกลบินเท่ากับ 2.5 และ 45^oซ ตามลำดับ เปปซินจากปลาตาหวานมีความคงตัวในช่วงพีเอช 1-6 เป็นระยะเวลา 30-60 นาที และมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 40^oซ เป็นระยะเวลา 30-120 นาที อย่างไรก็ตามพบว่ากิจกรรมลดลงอย่างเด่นชัดที่อุณหภูมิสูงกว่า 50^oซ กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ด้วยเปปสแตติน เอ ในขณะที่ EDTA สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วเหลือง (SBTI) และ E-64 มีผลยับยั้งเล็กน้อย

การเติมเปปซินจากปลาตาหวานที่ระดับ 20 กิโลกรัมต่อกรัมหนัง มีผลเพิ่มปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาตาหวาน คอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาตาหวานโดยการใช้กรดหรือการใช้เปปซินจากปลาตาหวานเป็นเวลา 48 ชม. ให้ผลผลิตเท่ากับร้อยละ 5.31 และ 18.34 (นน.แห้ง) ตามลำดับ การใช้กรดเพื่อให้หนังพองเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เปปซินจากปลาตาหวานที่ระดับ 20 กิโลกรัมต่อกรัมหนัง เป็นเวลา 48 ชม. ให้ผลผลิตร้อยละ 19.79 ซึ่งสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดโดยใช้เปปซินจากกระเพาะหมูที่ระดับเดียวกัน (ร้อยละ 13.03) คอลลาเจนจากหนังปลาสามารถจำแนกได้เป็นชนิด I โดยไม่พบพันธะไคซัลไฟด์ จากการศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสพบความแตกต่างเล็กน้อยของน้ำหนักโมเลกุลของคอลลาเจนที่ละลายในกรดและคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซิน โดยน้ำหนักโมเลกุลของสายแอลฟา 1 และแอลฟา 2 ในคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดมีค่าประมาณ 120 และ 112 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ขณะที่สายแอลฟา 1 และแอลฟา 2 ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 118 และ 111 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซินถูกย่อยสลายบางส่วนที่บริเวณเทโลเปปไทด์โดยเปปซิน ส่วนอุณหภูมิสูงสุดที่ก่อให้เกิดการเสถียรภาพของโปรตีน (T_{max}) ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดเท่ากับ 32.5^oซ ซึ่งสูงกว่าค่า T_{max} ของคอลลาเจนที่ละลายด้วยเปปซินประมาณ 1^oซ โดยทั่วไปคอลลาเจนทั้งหมดละลายได้ดีในช่วงพีเอช 2 ถึง 5 และมีกร

ละลายลดลงอย่างมากที่พีเอชเป็นกลาง โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงการละลายในสภาวะที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 3 แต่การละลายลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือ

ประสิทธิภาพการสกัดเจลาตินจากปลาตาหวานเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้กรดเพื่อทำให้น้ำพองตัวในสภาวะที่มีเปปซินจากปลาตาหวานที่ระดับ 15 กิโลกรัมต่อกรัมแห้ง ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชม. ก่อนการสกัดที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชม. โดยได้ผลผลิตร้อยละ 40.32 แต่อย่างไรก็ตามเจลาตินที่สกัดได้มีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ของสายบีตา แอลฟา 1 และ แอลฟา 2 โดยเปปซินไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับข้อการย่อยสลายดังกล่าว การย่อยสลายขององค์ประกอบของเจลาตินสามารถป้องกันได้โดยการใช้ SBTI เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมระหว่างการสกัด

เจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานด้วยวิธีธรรมดา (GT) มีองค์ประกอบทั่วไปใกล้เคียงกับเจลาตินจากกระดูกวัว (GB) อย่างไรก็ตามเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานโดยใช้เปปซินจากปลาตาหวาน (GA) และเปปซินจากกระเพาะหมู (GP) มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า (ประมาณร้อยละ 43) และมีปริมาณเถ้าสูงกว่า (ประมาณร้อยละ 47) เจลาตินชนิดต่างๆมีความแตกต่างของรูปแบบโปรตีน เจลาตินจากกระดูกวัวมีค่าความแข็งแรงเจล ค่า L^* และค่าความขุ่น สูงกว่าเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวาน นอกจากนี้พบการย่อยสลายของโมเลกุล เจลาตินใน GT ซึ่งสอดคล้องกับค่าความแข็งแรงเจลที่ต่ำสุด (56 กรัม) เจลาตินทั้งหมดมีการละลายสูงในช่วงพีเอช 1 ถึง 10 โดยทั่วไปสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และสมบัติการเกิดโฟมของ GA และ GP มีค่าใกล้เคียงกัน แต่มีความแตกต่างจาก GT และ GB เมื่อศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคพบว่าเจลจาก GB มีลักษณะ โครงสร้างที่ละเอียดและการจัดเรียงตัวที่หนาแน่นกว่าเจลเจลาตินจากปลาตาหวาน (GT GA และ GP) ซึ่งอาจเป็นผลจากความแตกต่างขององค์ประกอบและคุณลักษณะการเกิดเจลระหว่างโมเลกุลเจลาตินจากแหล่งที่แตกต่างกัน

Thesis Title	Uses of Pepsin for Collagen and Gelatin Extraction from Bigeye Snapper (<i>Priacanthus tayenus</i>) Skin
Author	Mr. Sitthipong Nalinanon
Major Program	Food Technology
Academic Year	2006

ABSTRACT

Pepsin from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) stomach was extracted and fractionated using ammonium sulfate precipitation (0-20% saturation). The fractionated bigeye snapper pepsin (BSP) had the purification fold of 33.7 with a yield of 73.1%. The optimal pH and temperature for hemoglobin hydrolysis were 2.5 and 45°C, respectively. BSP was stable in the pH range of 1-6 with the exposure time of 30-60 min. BSP was stable when incubated at temperature up to 40°C for 30-120 min. However, the sharp decrease in activity was noticeable at temperature above 50°C. The proteolytic activity was completely inhibited by pepstatin A, while ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), soybean trypsin inhibitor (SBTI) and 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanidinobutane (E-64) showed the negligible inhibitory effect.

Addition of BSP at a level of 20 kUnits/g defatted skin resulted in the increased content of collagen extracted from bigeye snapper skin. The yields of collagen from bigeye snapper skin extracted for 48 h with acid and with BSP were 5.31 and 18.74% (dry basis), respectively. With pre-swelling in acid for 24 h, collagen extracted with BSP at a level of 20 kUnits/g skin for 48 h had the yield of 19.79%, which was greater than that of collagen extracted using porcine pepsin at the same level (13.03%). The skin collagen was characterized to be type I with no disulfide bond. The electrophoretic study revealed the slight differences in molecular weight between acid-solubilized collagen and all pepsin-solubilized collagens. The molecular weight of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains in acid-solubilized collagen was estimated to be 120 and 112 kDa, respectively, whereas $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of pepsin-solubilized collagens had the molecular weight of 118 and 111 kDa, respectively. The result suggested that these pepsin-solubilized collagens might undergo partial cleavage at telopeptide region by pepsin treatment. The maximum transition temperature (T_{max}) of acid-solubilized collagen was observed at 32.5°C, which was

slightly higher than that of pepsin-solubilized collagens about 1°C. Generally, all collagens were highly solubilized in pH range of 2-5 and sharply decreased at the neutral pH. No changes in solubility were observed in the presence of NaCl up to 3% (w/v) and the decrease was more pronounced with increasing NaCl concentration.

The extraction efficiency of gelatin from bigeye snapper was augmented with acid swelling process in the presence of BSP at a level of 15 kUnits/g alkaline-treated skin at 4°C for 48 h before subjection to extracting at 45°C for 12 h, showing the yield of 40.32%. Nevertheless, the complete degradation of β , $\alpha 1$ and $\alpha 2$ -chains was observed in the resulting gelatin. The result indicated that no pepsin involved in the degradation. The degradation of gelatin components was prevented when SBTI at a concentration of 0.1 μM was incorporated during gelatin extraction.

Gelatin extracted from bigeye snapper skin by typical process (GT) had the similar composition to gelatin from bovine bone (GB). However, gelatin extracted from bigeye snapper skin treated with BSP (GA) and with porcine pepsin (GP) contained the lower protein content (~43%) with the higher ash content (~47%). Some differences in protein patterns of different gelatins were observed. GB exhibited the greater bloom strength, L^* -value and turbidity than did bigeye snapper skin gelatins. The substantial degradation of gelatin molecule in GT was coincidental with the lowest bloom strength (56 g). All gelatins showed high solubility at pH range of 1-10. Generally, emulsifying properties and foaming properties of GA and GP were similar, but were different from those of GT and GB. The microstructure study revealed that GB gel had the finer and denser strands than gels of bigeye snapper skin gelatin (GT, GA and GP), possibly due to the different composition and gelling characteristics between gelatin molecules from different origins.