



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การเตรียม โปรตีน ไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กรดร่วมกับสารรีดิวซิงที่อุณหภูมิสูง

The Preparation of Eggshell Membrane Protein Hydrolysate using Combination of Acid and Reducing Agent at High Temperature

นามผู้วิจัย นางสาวคณนารถ พิกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนบุญชร, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( อาจารย์สายพิน ทานัชมาสัย, D.Eng. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณิ จิระภาคย์กุล, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กรดร่วมกับสารรีดิวซิงที่อุณหภูมิสูง

The Preparation of Eggshell Membrane Protein Hydrolysate using Combination of Acid and Reducing Agent at High Temperature

โดย

นางสาวคณนารถ พิกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

พ.ศ. 2557

คุณารณ พิกุล 2557: การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเชื้อเปลือกไข่โดยใช้กรดร่วมกับสารรีดิวซิง ที่อุณหภูมิสูง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษร, Ph.D. 119 หน้า

เนื่องจากเปลือกไข่เป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงศึกษาภาวะการ แยกเชื้อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่และการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเชื้อเปลือกไข่ พบว่าการแยกเชื้อทำได้ โดยแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อเปลือกไข่ที่ได้มีโปรตีนสูงถึง 41.90 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักเปียก) โครงสร้างระดับจุลภาคของ เชื้อเปลือกไข่ตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์แสงเลเซอร์แบบส่องกราด ซึ่งว่าสารละลายดังกล่าว ทำให้เชื้อเปลือก ไข่เกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยโปรตีนที่เป็นเส้นใยยังคงอยู่ในโครงสร้าง เมื่อทำการย่อยเชื้อเปลือกไข่ 1.5 กรัม ด้วยสารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร และเติมสารรีดิวซิง คือ แอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัม (C) หรือ 2-เมอแคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตร (M) ต่อ 1 กรัมโปรตีน หรือ ไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) ให้ความร้อนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 90 หรือ 120 องศาเซลเซียส (ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) พบว่าเชื้อเปลือกไข่หลังการย่อยที่ 90 องศาเซลเซียส มีการ ละลายต่ำ แต่เชื้อเปลือกไข่ที่ย่อยที่ 120 องศาเซลเซียส เกิดการละลายจนสังเกตด้วยตาเปล่าไม่พบชิ้นส่วนเชื้อ เปลือกไข่ สารละลายมีความใส โดยให้ผลเช่นเดียวกันในการเติม C, M และ NR ตรวจสอบสารละลายไฮโดรไล เสต (ย่อยที่ 120 องศาเซลเซียส) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบอนุภาคขนาดเล็กโปร่งใสแขวนลอยอยู่ใน สารละลาย อนุภาคมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.74, 0.69 และ 0.80 ไมโครเมตร ใน C, M และ NR ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในไฮโดรไลเสต พบว่าไฮโดรไลเสตมีค่าเปอร์เซ็นต์ของแข็ง ที่ละลายได้เท่ากับ 1.16 1.08 และ 0.96 โดยการไม่เติมสารรีดิวซิงให้ค่าต่ำกว่าที่มีการเติมสารรีดิวซิงอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และมีผลได้การย่อยเท่ากับ 94.64, 88.45 และ 80.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มี ปริมาณโปรตีน 13.13, 10.76 และ 11.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไฮโดรไลเสต (วิเคราะห์โดยวิธี Lowry) จากผล SDS-PAGE พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเชื้อเปลือกไข่ทุกทรีทเมนต์ (ย่อยที่ 120 องศาเซลเซียส) ประกอบด้วย เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลไม่สูงกว่า 6.5 กิโลดาลตัน ดังนั้นการใช้กรดแอสซิดิกร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิ 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต จากเชื้อเปลือกไข่

Danoonart Pikul 2014: The Preparation of Eggshell Membrane Protein Hydrolysate using Combination of Acid and Reducing Agent at High Temperature. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Associate Professor Wunwiboon Garnjanagoonchorn, Ph.D. 119 pages.

Utilization of eggshell waste was emphasized in this study. The research aimed to study the condition for eggshell membrane (ESM) separation and develop a process to hydrolyze ESM. ESM was separated by soaking eggshell in 0.5 M acetic acid at 28°C for 72 hr. The resulting ESM had high protein 41.90% (wet basis). The microstructure of separated ESM examined under Confocal Laser Scanning Microscope revealed that ESM soaking in acetic acid or in water have similar structures with minimal changes. Protein fibers remained in intact structure. ESM 1.5 g was hydrolysed with 10% acetic acid, 80 ml with the addition of reducing agent L-cysteine hydrochloride monohydrate (C) at 0.9 mg/g protein or 2-mercaptoethanol (M) at 9.22 µl/g protein or no reducing agent (NR) then heated for 8 h at 90 or 120°C, 20 psi. The results showed that low solubilisation occurred after ESM hydrolysis at 90°C meanwhile clear solutions were obtained at 120°C for all C, M and NR. The microscopic observation of hydrolysate (digested at 120°C) indicated that there were small transparent particles suspended in solution. The average diameter of particles were 0.74, 0.69, 0.80 µm, in C, M and NR respectively. Hydrolysis showed percent soluble solids and percent yield of 1.16 1.08 and 0.96; 94.64, 88.45 and 80.25 in C, M and NR respectively. Treatment of NR showed the lowest ( $p \leq 0.05$ ) percent soluble solid. Hydrolysates contained protein content of 13.13, 10.76 and 11.66 mg/ml hydrolysate, respectively (Lowry method). Furthermore, SDS-PAGE of all three liquid hydrolysates contained peptides of less than 6.5 kDa. Thus the use of acetic acid plus heating at 120°C (20 psi) was suitable for the production of ESM hydrolysate.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วรณวิบูลย์ กาญจนบุญชู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร.สายพิณ ทานัชมาสัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาช่วยเหลือให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิจัย ตลอดจนสละเวลาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. กนิษฐพร วังใน ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ที่ประสาทความรู้อันเป็นประโยชน์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์มาศอุบล ทองงาม ที่ได้เสียสละเวลามาช่วยสอน และใช้กล้องจุลทรรศน์แสงเลเซอร์แบบส่องกราด ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เจ้าหน้าที่อาคารแปรรูป ที่อำนวยความสะดวก ให้ความรู้ และแนะนำในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการศึกษางานวิจัย และขอขอบพระคุณร้านเซ็นทรัลเบเกอรี่ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เปลือกว่าสำหรับทำการวิจัย

ขอขอบคุณ พี่หลิว พี่นุ่น พี่ดาว พี่จ้อย พี่นก พี่เอ็ม เบสท์ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ สมาชิกห้องปฏิบัติการ 2314 รวมถึงนิสิตปริญญาโทและเอก สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารทุกท่านที่คอยช่วยเหลือในการทำงานวิจัย และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัวทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ให้การสนับสนุนกำลังใจ ทุ่มเท และเป็นที่สำคัญตลอดระยะเวลาในการศึกษาจนงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วง

คณนารถ พิภูล

พฤษภาคม 2557

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	34
อุปกรณ์	34
วิธีการ	39
ผลและวิจารณ์	46
สรุปและข้อเสนอแนะ	77
สรุป	77
ข้อเสนอแนะ	79
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	80
ภาคผนวก	91
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	92
ภาคผนวก ข การคำนวณร้อยละผลได้	98
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry	100
ภาคผนวก ง การการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดย sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	104
ภาคผนวก จ วิเคราะห์ผลทางสถิติ	109
ภาคผนวก ฉ การคำนวณปริมาณเชื้อเปลือกไข่ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต	113
ภาคผนวก ช การใช้ไมโครมิเตอร์	115
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	119

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 องค์ประกอบต่างๆ ของเปลือกไข่	11
2 องค์ประกอบกรดแอมิโนของเคลือบผิวไข่และเยื่อเปลือกไข่	13
3 องค์ประกอบต่างๆ ของเยื่อเปลือกไข่	15
4 การตรวจประเมินลักษณะของเยื่อเปลือกไข่ที่แช่ในสารละลายที่สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน	47
5 ผลของความเข้มข้นของกรดแอสซิดิกและอนุหภูมิในการแช่เปลือกไข่ต่อความหนาที่ระยะเวลาต่างๆ	53
6 ผลของตัวแปรในการแยกเยื่อเปลือกไข่ต่อค่าพีเอชของสารละลายหลังการแช่เยื่อเปลือกไข่	55
7 องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อเปลือกไข่ที่แยกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) และเยื่อเปลือกไข่ที่แยกโดยสารละลายกรดแอสซิดิก 0.5 โมลาร์ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ESMA)	57
8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแยกเปลือกไข่ด้วยสภาวะต่างๆ	65
9 ขนาดอนุภาคของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเยื่อเปลือกไข่ที่เติมสารรีดิวซิงต่างกันแล้วย่อยสลายที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้เลนส์วัตถุ $\times 40$	72
10 เพอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ และเปอร์เซ็นต์ผลได้ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเยื่อเปลือกไข่ที่สภาวะการย่อยต่างๆ กัน	73
11 ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเยื่อเปลือกไข่ที่เติมสารรีดิวซิงต่างกันแล้วทำการย่อยที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง	74
<b>ตารางผนวกที่</b>	
ง1 อัตราส่วนสำหรับการเตรียม SDS-PAGE Separating gel และ Stacking gel	108

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
จ1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้นของกรดแอสซิดิก (0, 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์) ที่เวลาและอุณหภูมิในการแช่เปลือกไข่เพื่อแยกเยื่อเปลือกไข่ต่อค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้	110
จ2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้นของกรดแอสซิดิก (0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์) ที่เวลาและอุณหภูมิในการแช่เปลือกไข่เพื่อแยกเยื่อเปลือกไข่ต่อค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้	111
จ3 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการแช่เปลือกไข่ต่อค่าความหนาที่สารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้นต่างๆ	112

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของไขไก่โดยการตัดตามแนวยาว	9
2 เปลือกไข่ผ่าตามหน้าตัดด้านข้างขยายใหญ่จากของจริง	10
3 เส้นใยที่ทอประสานกันเป็นตาข่ายของเยื่อเปลือกไข่ในธรรมชาติ ตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้ FEI Sirion 200 field emission gun scanning electron microscope (FESEM)	14
4 ลักษณะโครงสร้างของพันธะไดซัลไฟด์	18
5 กระบวนการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์	19
6 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์	21
7 การเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนการแยกเยื่อเปลือกไข่ (1) เปลือกไข่ (2) เปลือกไข่ที่บอบให้แตก (3) การแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอซิดิกความเข้มข้นต่างๆ และ (4) เยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้	46
8 การเปลี่ยนแปลงของเปลือกไข่ที่แช่ในสารละลายกรดแอซิดิก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา (1) 24 ชั่วโมง (2) 48 ชั่วโมง และ (3) 72 ชั่วโมง	47
9 เยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอซิดิก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา (1) 24 (2) 48 และ (3) 72 ชั่วโมง	51
10 โครงสร้างเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอก (outer shell membrane) ด้านผิวนอกที่ติดกับเปลือกไข่ (1) เยื่อเปลือกไข่ที่แยกออกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) แล้วใช้มือดึงแยกเยื่อออกจากเปลือกไข่ (2) เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในกรดแอซิดิก 0.5 โมลาร์ (ESMA 0.5) และ (3) เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในกรดแอซิดิก 1.5 โมลาร์ (ESMA 1.5) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ลูกศรชี้แสดงบริเวณจุดเชื่อมของเส้นใย (junction zone)	61
11 โครงสร้างเยื่อเปลือกไข่ชั้นใน (inner shell membrane) บริเวณด้านในติดกับไข่ขาว โดย (1) เยื่อเปลือกไข่ที่แยกออกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) (2) เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในกรดแอซิดิก 0.5 โมลาร์ (ESMA 0.5) และ (3) เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในกรดแอซิดิก 1.5 โมลาร์ (ESMA 1.5) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลูกศรชี้แสดงโปรตีนทรงกลมใน limiting membrane	63

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเยื่อเปลือกไข่ที่สภาวะต่างๆ (ก) เยื่อเปลือกไข่ในสารละลายบรรจุในขวดแก้วก่อนนำไปให้ความร้อน (ข) เยื่อเปลือกไข่ในสารละลายหลังนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ค) สารละลายของเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการให้ความร้อนในหม้อนึ่งความดันสูง (120 องศาเซลเซียส) นาน 8 ชั่วโมง	67
13 โครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง (1) เดิมแอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัม โปรตีน (2) เดิม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัม โปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ และ (3) ไม่เติมสารรีดิวซิง สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ดิคเลนส์วัตถุ x10	68
14 โครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่สดที่ผ่านการลอกออกจากเปลือกไข่ สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ดิคเลนส์วัตถุ x10	69
15 โปรตีนไฮโดรไลสได้จากเยื่อเปลือกไข่ (ก่อนกรอง) ที่ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง โดย (ก) เดิมแอล-ซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัม โปรตีน (ข) เดิม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัม โปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ และ (ค) ไม่เติมสารรีดิวซิง (ภาพ ก1-ค1, สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้เลนส์วัตถุ x10 ส่วนภาพ ก2-ค2, สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้เลนส์วัตถุ x 40	71
16 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 12 เปอร์เซ็นต์ แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนในไฮโดรไลสได้จากเยื่อเปลือกไข่ (หลังกรอง) ที่ผ่านการย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 8 ชั่วโมง โดยใช้กรดแอสซิติคความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (lane a) หรือ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (lane b) หรือไม่เติมสารรีดิวซิง (lane c) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (lane M)	75

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน	103
ช1 ส่วนประกอบของไมโครมิเตอร์	116
ช2 ตัวอย่างสเกลบนไมโครมิเตอร์ที่วัดได้	117
ช3 ตัวอย่างไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน	118
ช4 ตัวอย่างไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพไม่พร้อมใช้งาน	118

## การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กรดร่วมกับสารรีดิวซิง ที่อุณหภูมิสูง

### The Preparation of Eggshell Membrane Protein Hydrolysate using Combination of Acid and Reducing Agent at High Temperature

#### คำนำ

ไข่ที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ได้แก่ ไข่ไก่ ไข่เป็ด และไข่นกกระทา เป็นต้น ไข่ไก่ใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมเบเกอรี่ อุตสาหกรรมอาหารทะเลเทียม (imitation seafood) เส้นบะหมี่ ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน (confectionary) น้ำสลัด (salad dressing) เป็นต้น จึงทำให้มีเปลือกไข่เป็นเศษเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ในปัจจุบันมีการนำเปลือกไข่มาใช้ประโยชน์ โดยนำมาทำปุ๋ย ทำอาหารสัตว์ และเมื่อไม่นานมานี้มีการนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ไข้แล้ว (เคลินิวส์, 2553) ในไข่ 1 ฟอง ประกอบด้วยเปลือกไข่เป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 9-11 เปอร์เซ็นต์ ของไข่ทั้งฟอง (Mine, 2008) เปลือกไข่มีส่วนประกอบหลัก คือ สารประกอบแคลเซียมคาร์บอเนต 94 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมฟอสเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ และอินทรีย์วัตถุอื่นอีก 4 เปอร์เซ็นต์ (Stadelman and Cotterill, 1977) ในเปลือกไข่จะมีเยื่อเปลือกไข่ประมาณ 3.1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของเปลือกไข่ (Carrino *et al.*, 1996) ซึ่งเยื่อเปลือกไข่เป็นแหล่งของโปรตีนธรรมชาติ โดยเยื่อเปลือกไข่มีโปรตีน 95 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่พบ ได้แก่ เคราติน (keratin) คอลลาเจน (collagen) (type I V และ X) ออสตีโอพอนติน (osteopontin) ไชอะโลโปรตีน (sialoprotein) เป็นต้น และพบสารประกอบแซ็กคาไรด์จำนวนเล็กน้อย (Yi *et al.*, 2004)

เยื่อเปลือกไข่มีองค์ประกอบที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ แต่การบริโภคเยื่อเปลือกไข่โดยตรงอาจไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่มีองค์ประกอบเป็นเส้นใยโปรตีนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่มีความแข็งแรงสูงคล้ายกับเส้นใยเคราติน (Nys *et al.*, 2004) ซึ่งโครงสร้างเส้นใยของเยื่อเปลือกไข่มีพันธะไดซัลไฟด์สูง จึงทำให้เส้นใยสานกันอย่างหนาแน่น ทำให้ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะปกติทั่วไป จึงต้องมีการใช้สารรีดิวซิง (reducing agent) ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลาย โดย Benjakul *et al.* (2005) รายงานว่าแอล-ซิสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์ โมโนไฮเดรต ช่วยเพิ่มปริมาณซัลไฟไฮดริลและลดปริมาณพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน Yi *et al.*

(2004) รายงานวิธีการทำโปรตีนที่ละลายได้จากเยื่อเปลือกไข่ (soluble eggshell membrane protein, SEP) โดยละลายเยื่อเปลือกไข่ด้วยสารละลายกรด 3-เมอร์แคปโตโพรพิโอนิก ซึ่งแสดงสมบัติเป็นสารรีดิวซิง ร่วมกับกรดอะซีติกทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโครงสร้างระดับที่ 3 และ 4 ของโปรตีน ดังนั้นการใช้สารรีดิวซิง ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ เมื่อนำมาใช้กับเยื่อเปลือกไข่น่าจะเพิ่มความสามารถในการละลายได้ของเยื่อเปลือกไข่ Karthikeyan *et al.* (2007) ระบุว่า การใช้ความดันสูง (10-15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) และ/หรืออุณหภูมิสูง (80-140 องศาเซลเซียส) ร่วมกับสารละลายกรดหรือเบส เวลาการบ่มมากกว่า 2-3 ชั่วโมง สามารถทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของเคราตินได้

ในอดีตได้มีการนำเยื่อเปลือกไข่มาใช้ทำอาหารให้กับหมูเมื่อร่างกายเกิดการบาดเจ็บบริเวณข้อ เพื่อบำบัดรักษาเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ดังการรายงานในสิทธิบัตร (US 2007/0178170 A1) ว่า การรับประทานเยื่อเปลือกไข่จะช่วยลดการอักเสบของข้อกระดูกและสภาวะที่มีอาการอักเสบอื่นๆ ได้ (Vlad, 2007) นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ Devore *et al.* (2007) เกี่ยวกับวิธีการแยกเยื่อเปลือกไข่และการย่อยเยื่อเปลือกไข่รวมทั้งการนำไปใช้ประโยชน์ โดยพบว่าทั้งเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ สามารถลดอาการบาดเจ็บของข้อกระดูก และลดการอักเสบของกล้ามเนื้อได้

เนื่องจากในประเทศไทยมีเปลือกไข่เป็นเศษเหลือทิ้งจำนวนมาก และในเปลือกไข่มีเยื่อเปลือกไข่ที่มีองค์ประกอบที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ อย่างไรก็ตามการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ทำได้ยาก วิธีการทำลายเยื่อเปลือกไข่ยังมีข้อมูลที่จำกัด นอกจากนี้ข้อมูลการค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับเยื่อเปลือกไข่ของไทยมีน้อยมาก ดังนั้นเพื่อประโยชน์ในการเพิ่มมูลค่าของเยื่อเปลือกไข่ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ด้วยการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ จากนั้นศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเยื่อเปลือกไข่ โดยการนำเยื่อเปลือกไข่ที่ได้มาย่อยสลายที่สภาวะต่าง ๆ เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของเยื่อเปลือกไข่ ทำให้สามารถเติมแต่งในผลิตภัณฑ์อาหารได้ง่าย และนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเชื้อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่
2. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของเชื้อเปลือกไข่สด และเชื้อเปลือกไข่ที่แยกได้จากสภาวะการทดลองที่ดีที่สุด
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเชื้อเปลือกไข่ โดยใช้สารละลายกรดแอสिटิกร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูงและความดัน และการเติมสารรีดิวิง
4. ศึกษาสมบัติบางประการของสารสกัดจากเชื้อเปลือกไข่

## การตรวจเอกสาร

### 1. ปริมาณเปลือกไข่ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้ง

เปลือกไข่เป็นวัสดุเหลือทิ้งที่หาได้ง่ายและมีปริมาณมาก ตามรายงานของสมาคมผู้ผลิตผู้ค้า และส่งออกไข่ไก่ ได้สรุปสถิติการบริโภคไข่ไก่ภายในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2555 พบว่ามีการบริโภคประมาณ 10,923.87 ล้านฟอง และการบริโภคปี พ.ศ. 2556 ปริมาณการบริโภคเพิ่มขึ้นจากปี 2555 โดยพบว่ามีการบริโภคประมาณ 12,852 ล้านฟอง เนื่องจากไข่ไก่สามารถนำมาประกอบอาหารได้หลากหลายและสะดวก (สมาคมผู้ผลิต ผู้ค้า และส่งออกไข่ไก่, 2555) เมื่อคิดคำนวณปริมาณเปลือกไข่จากรายงานการบริโภค โดยไข่ไก่ 1 ฟอง มีน้ำหนักเฉลี่ย 61 กรัม มีส่วนของเปลือกไข่อยู่ร้อยละ 11 ทำให้ประมาณได้ว่าในปี 2555 มีปริมาณเปลือกไข่ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้ง 73,299.17 ตัน และในปี 2556 มีปริมาณเปลือกไข่ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งประมาณ 86,236.92 ตัน ในจำนวนนี้ส่วนหนึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการแปรรูปไข่ต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมขนมอบ อุตสาหกรรมไข่ผง อุตสาหกรรมเนื้อไข่เหลว เป็นต้น เปลือกไข่สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยล้างเปลือกไข่ด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วกำจัดฝุ่นและแบคทีเรีย ตามด้วยการเป่าลมร้อนให้เปลือกไข่แห้ง จากนั้นนำเปลือกไข่เข้าเครื่องบด (micropulverizer) ให้เป็นผงละเอียด พร้อมทั้งพ่นไอโซนเข้าไปในเครื่องบดเพื่อทำลายแบคทีเรียที่ตกค้าง จะได้แคลเซียมคาร์บอเนตจากเปลือกไข่ที่ปราศจากแบคทีเรีย นำไปผสมในอาหารสัตว์ หรือนำไปใช้เป็นปุ๋ย (Contesso, 1947) อย่างไรก็ตามปริมาณเปลือกไข่ส่วนใหญ่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์และถูกทิ้งเป็นวัสดุเหลือทิ้ง

#### 1.1 เทคโนโลยีการใช้ประโยชน์จากเปลือกไข่

วิชัย (2555) รายงานว่า เทคโนโลยีที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงเปลือกไข่ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งให้อยู่ในรูปที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปเปลือกไข่ ดังนี้

##### 1.1.1 แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ )

แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่แล้วในเปลือกไข่ (98.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปลือกไข่) การนำไปใช้อาศัยเพียงเทคโนโลยีชาวบ้าน คือ การตากแห้งแล้วนำเปลือกไข่ไปบด เปลือกไข่บดยังคงมีธาตุอาหารอยู่หลายชนิดจึงสามารถใช้ทำปุ๋ย หรือใช้ไล่แมลงได้

เนื่องจากมีธาตุกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เปลือกไข่บดมีแคลเซียมสูงสามารถใช้ปรับสภาพดินที่เป็นกรดให้เป็นกลางมากขึ้นได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เปลือกไข่บดเป็นตัวดูดซับโลหะหนักบางชนิด เช่น แคดเมียมและตะกั่วที่ปนเปื้อนอยู่ในดินหรือดูดซับตะกั่วจากน้ำเสียของโรงงานผลิตแบตเตอรี่ ใช้ปรับพีเอชของน้ำเสียแทนการใช้ปูนขาว และใช้เป็นสารช่วยทำให้เกิดการตกตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสีย ในทางโภชนาการเปลือกไข่บดใช้ผสมในอาหารเพื่อเสริมแคลเซียม เช่น ผสมเปลือกไข่บดในผลิตภัณฑ์ขนมอบกรอบ และใช้เป็นแหล่งแคลเซียมเสริมในอาหารสัตว์

### 1.1.2 แคลเซียมออกไซด์ (CaO)

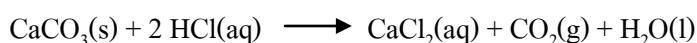
แคลเซียมออกไซด์ ได้จากการใช้เทคโนโลยีการเผาเปลือกไข่ที่อุณหภูมิสูงในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนเรียกว่าระบบไพโรไลซิส (pyrolysis) ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่ากระบวนการแคลไซน์ชั่น (calcination) ดังสมการ



แคลเซียมออกไซด์ที่ได้จากเปลือกไข่มีคุณสมบัติเหมือนกับแคลเซียมออกไซด์ที่ได้จากการเผาหินปูนหรือที่รู้จักกันในชื่อปูนขาว (lime) ที่มีจำหน่ายทั่วไป จึงสามารถนำไปใช้ปรับสภาพของดินและน้ำที่เป็นกรด ใช้ในการผลิตโซดาไฟและสารฟอกขาว และเป็นส่วนผสมของปูนฉาบ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นสารดูดความชื้นและสารเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในการผลิตไบโอดีเซลได้อีกด้วย

### 1.1.3 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl<sub>2</sub>)

การผลิตแคลเซียมคลอไรด์จากเปลือกไข่ต้องอาศัยเทคโนโลยีการสกัดด้วยกรด โดยแคลเซียมคาร์บอเนตจากเปลือกไข่จะทำปฏิกิริยากับกรดเกลือ (HCl) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแคลเซียมคลอไรด์ โดยมีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังสมการ



แคลเซียมคลอไรด์ใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มความแน่นเนื้อในผลไม้ เช่น แคนตาลูปและฝรั่ง ผสมในไอศกรีมเพื่อทำให้เนื้อสัมผัสดีขึ้น นอกจากนี้ในด้านสิ่งแวดล้อมแคลเซียม

คลอไรด์ยังมีความสามารถในการจับโลหะหนักได้ดีอีกด้วย ตัวอย่างเช่น การชะล้างแคลเซียมที่ปนเปื้อนในดิน

ในประเทศไทยมีงานวิจัยมากมาย ที่นำเปลือกไข่มาใช้ประโยชน์ ดังนี้

ศุภวรรณ (2540) ศึกษาลดปริมาณตะกั่วด้วยเปลือกไข่ ภายใต้การดูดซับอย่างต่อเนื่อง โดยใช้เปลือกไข่ขนาดอนุภาค 20-40, 40-60 และ 60-80 เมช อัตราการไหลต่อปริมาตรของเบดเปลือกไข่ 0.5, 1.5, 2.5 และ 3.5 มิลลิลิตรต่อนาที และพีเอชเท่ากับ 3, 5, 7 และ 9 พบว่าทุกสภาวะการทดลอง เปลือกไข่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณตะกั่ว คิดเป็น 99 เปอร์เซ็นต์ เนื่องมาจากตะกั่วทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนตในเปลือกไข่ ได้เป็นเลดคาร์บอเนต ( $Pb(CO_3)_2$ ) ตกตะกอนอยู่ในคอลัมน์ร่วมกับการจับโลหะหนักของหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนในเยื่อ ทำให้เปลือกไข่สามารถลดโลหะหนักได้ดี และเมื่ออัตราการไหลต่อปริมาตรเบดของเปลือกไข่ช้า เวลาในการสัมผัสระหว่างสารละลายกับเปลือกไข่นานขึ้น ตะกั่วอาจเปลี่ยนรูปเป็น  $Pb(OH)_2$  ตกตะกอน เพราะสารละลายมีสภาวะเป็นเบส ซึ่งเป็นอีกวิธีที่ช่วยลดโลหะหนักในน้ำ

อลงกต (2541) ได้ทดลองผลิตแคลเซียมคลอไรด์จากเปลือกไข่ไก่ โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวสกัด นำไปหมุนเหวี่ยงแยกส่วนใสออก แล้วให้ความร้อนเพื่อตกตะกอนโปรตีน จากนั้นเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อแยกส่วนใสออกมา นำส่วนใสที่ได้ไประเหยบนแผ่นให้ความร้อนอุณหภูมิ 110-115 องศาเซลเซียส จะได้แคลเซียมคลอไรด์ตกผลึกออกมา นอกจากนี้อลงกตยังได้นำแคลเซียมคลอไรด์ที่ผลิตได้จากเปลือกไข่ไปทดลองเป็นสารเพิ่มความแน่นเนื้อในเงาะกระป๋องเปรียบเทียบกับเงาะกระป๋องที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์ทางการค้า พบว่า ค่าเฉลี่ย peak force ที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Texture Analyzer ของเงาะกระป๋องที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์จากเปลือกไข่ และเงาะกระป๋องที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์ทางการค้าไม่แตกต่างกัน แสดงว่า แคลเซียมคลอไรด์จากเปลือกไข่ไก่ทำให้เนื้อเงาะกระป๋องมีความแน่นเนื้อใกล้เคียงกับเนื้อเงาะที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์ทางการค้า

ประสิทธิ์ และ อรไท (2542) ได้ศึกษาความสามารถของวัสดุเหลือทิ้งจากสัตว์ คือ เปลือกไข่และเกล็ดปลา (ขนาด 40-60 เมช) ในการดูดซับโลหะหนักตะกั่ว ( $Pb^{2+}$ ) ไอออนของนิกเกิล ทองแดง และโครเมียม สรุปลงได้ว่าเปลือกไข่ และเกล็ดปลาดูดซับโลหะหนักที่มีโมเลกุลขนาดเล็กได้ดีกว่าโลหะหนักที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่

ยูวรัตน์ (2544) ศึกษาความสามารถในการดูดซับไอออนแคดเมียมของเปลือกไข่ 2 ชนิด คือเปลือกไข่ธรรมชาติ ซึ่งลอกเยื่อเปลือกไข่ออก และเปลือกไข่ปลอดโปรตีน โดยนำไปแช่ใน สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วัน พบว่าเปลือกไข่ขนาดเล็ก (20-40 เมช) ดูดซับแคดเมียมได้มากกว่าขนาดใหญ่ (60-80 เมช) และการดูดซับของเปลือกไข่ ทั้งสองชนิดเกิดจากการแลกเปลี่ยนไอออน แต่เปลือกไข่ธรรมชาติอาจจะมีเยื่อโปรตีนในเปลือกไข่ที่ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล หมู่เอมีน และกลุ่มซัลเฟตของโปรตีน ร่วมจับโลหะหนักแคดเมียม จึง ทำให้เปลือกไข่ธรรมชาติดูดซับแคดเมียมได้มากกว่าเปลือกไข่ปลอดโปรตีน

## 2. ส่วนประกอบของไข่

### 2.1 ส่วนประกอบที่สำคัญของไข่ (สุวรรณ, 2529)

2.1.1 เปลือกไข่ (egg shell) ในไข่ไก่ขนาด 61 กรัม มีเปลือกหนักประมาณ 6 กรัม สีเปลือกอาจแตกต่างกันตามพันธุ์ของไก่ สีไข่ไม่มีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการ เปลือกไข่จะมีรูขนาดเล็กมากกว่า 7,000 - 17,000 รู กระจายอยู่บนเปลือกไข่ ซึ่งมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น (Powrie and Nakai, 1985; William and Owen, 1995; Pramanpol and Nitayapat, 2006; Li-Chan and Kim, 2008) อากาศและความชื้นจึงสามารถผ่านเข้าไปภายในไข่ ผ่านรูเล็กๆ ที่อยู่ในเปลือกไข่ เมื่อไข่ออกมาใหม่ๆ จากตัวแม่ไก่ จะมีเคลือบผิวไข่ที่เปลือกไข่ด้านนอกเพื่อปิดรูเปลือกป้องกันไม่ให้อากาศและน้ำผ่านเข้าไปได้ เปลือกไข่ในช่วงแรกๆ จึงมีลักษณะเป็นนวล เมื่อเก็บไว้นานๆ เมื่อกเหล่านี้อาจแห้งไป และหลุดออก เปลือกไข่จึงมีอากาศถ่ายเทเข้าออกได้และเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ทำให้ไข่เสียได้

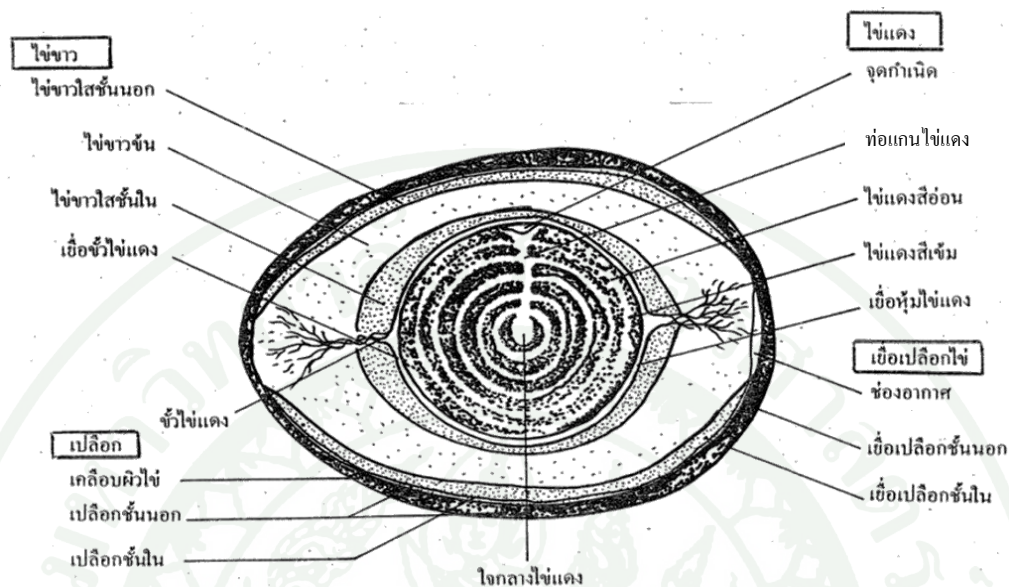
2.1.2 เยื่อเปลือกไข่ (egg shell membrane) มีอยู่ด้วยกัน 2 ชั้น คือ เยื่อชั้นนอกที่ติดเปลือกไข่เรียกว่า shell membrane และเยื่อชั้นในที่ติดกับไข่ขาว เรียกว่า egg membrane เยื่อชั้นนอกและชั้นในจะชิดกันตลอด แต่แยกกันที่ด้านข้างของไข่บริเวณช่องอากาศ

2.1.3 ช่องอากาศ (air cell) เป็นช่องว่างที่อยู่บริเวณด้านข้างของไข่ อยู่ระหว่างเยื่อชั้นนอกและเยื่อชั้นใน เมื่อไข่ออกมาใหม่ๆ อุณหภูมิของไข่ยังสูง จึงไม่มีช่องว่าง แต่เมื่อไข่เย็นลงของเหลวภายในไข่หดตัว ทำให้เกิดเป็นช่องอากาศขึ้น และในระหว่างเก็บรักษาไข่ถ้าหากมีน้ำระเหยออกไปมากก็จะทำให้ช่องอากาศใหญ่ขึ้นด้วย

2.1.4 ไข่ขาว (albumen) เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ในไข่ไก่ขนาด 60 กรัม 1 ฟอง จะมีไข่ขาวน้ำหนักประมาณ 30-35 กรัม ไข่ขาวทำหน้าที่พุงให้ไข่แดงอยู่คงที่ ช่วยป้องกันไม่ให้ไข่แดงแตก ไข่ขาวมีทั้งหมด 3 ชั้น ไข่ขาวชั้นนอกสุดจะค่อนข้างเหลว อยู่ติดกับเยื่อเปลือกไข่ ถัดมาเป็นไข่ขาวชั้น มีปริมาณมากกว่าครึ่งของไข่ขาวทั้งหมด ไข่ขาวชั้นจะมีลักษณะเป็นเส้นใยชั้นๆ (semisolid fiber) ที่รวมกับส่วนที่เป็นของเหลวจึงทำให้ดูข้นขึ้น ส่วนชั้นในสุดเป็นไข่ขาวเหลว ไข่ขาวมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก (88 เปอร์เซ็นต์) มีโปรตีนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ มีไขมันบ้างเล็กน้อย โปรตีนในไข่ขาวมีหลายชนิด เช่น โคนัลบูมิน (conalbumin) โอวัลบูมิน (ovalbumin) อะวิดิน (avidin) ไลโซไซม์ (lysozyme) โอโวมิวซิน (ovomucin) เป็นต้น

2.1.5 ไข่แดง (yolk) ไข่ไก่ขนาด 60 กรัม 1 ฟอง มีไข่แดงประมาณ 13-20 กรัม ไข่แดงจะแยกออกจากไข่ขาว โดยมีเยื่อหุ้มไข่แดง (vitelline membrane) และมีเส้นยึดไข่แดงให้ลอยอยู่ตรงกลางของไข่ขาว ไข่แดงมีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณ 52 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 14.3 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 30 เปอร์เซ็นต์ มีส่วนของแร่ธาตุฟอสฟอรัส เหล็ก แคลเซียม โพแทสเซียม ไอโอดีน ซีลีเนียม สังกะสีและทองแดงมากกว่าในไข่ขาว มีวิตามินเอและวิตามินบี 2 สูง ไขมันในไข่ประกอบด้วยไลโปโปรตีน ไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล และเลซิติน

โครงสร้างที่สำคัญของไข่ไก่แสดงโดยการตัดตามแนวยาวได้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไข่ไก่โดยการตัดตามแนวยาว

ที่มา: วรรณวิบูลย์ (2539)

### 3. โครงสร้างของเปลือกไข่

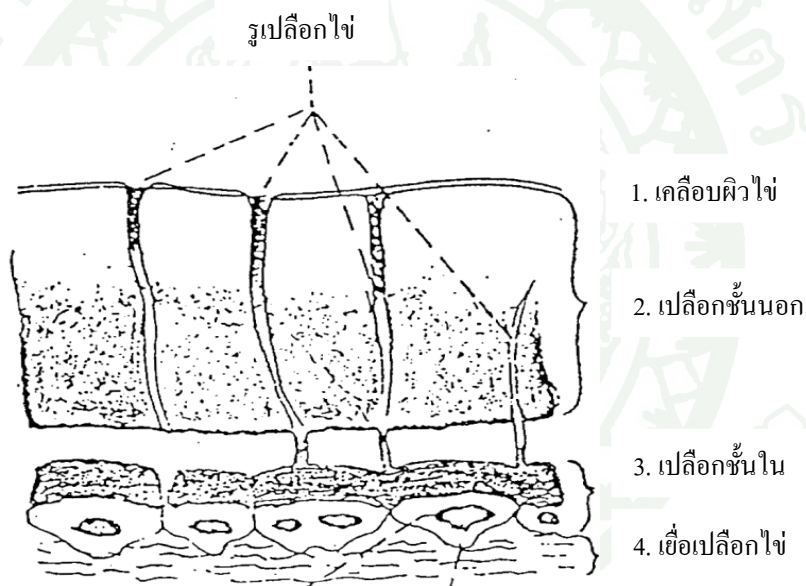
เปลือกไข่สามารถแบ่งเป็นชั้นต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.1 เคลือบผิวไข่ (cuticle) เป็นชั้นเยื่อมีวชิินที่เคลือบผนังแน่นกับผิวนอกของเปลือกไข่ มีความหนาประมาณ 10 ไมครอน มีหน้าที่ป้องกันการสูญเสียความชื้น การผ่านเข้าไปในไข่ของ จุลินทรีย์ และมีคุณสมบัติให้แก๊สผ่านเข้าออกได้ เคลือบผิวไข่สามารถหลุดออกได้ง่ายโดยการล้าง น้ำหรือแช่ในสารละลายกรด

3.2 เปลือกไข่ชั้นนอก (spongy layer) เปลือกไข่ชั้นนอกมีความหนา 2 ใน 3 ของเปลือกไข่ ทั้งหมดอยู่ติดกับเปลือกชั้นใน ประกอบด้วย ผลึกแคลเซียมเล็กๆ ผนังกันแน่น และมีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบรองลงมา เปลือกไข่ชั้นนอกนี้จะให้ความเป็นรูปทรงและความแข็งแรงแก่

เปลือกไข่ โดยความแน่นและความแข็งแรงจะมีมากที่ผิวด้านนอก เพราะมีลักษณะเป็นผลึกเรียงกันแน่น นอกจากนี้ยังมีรูเล็กๆ จำนวนมากเชื่อมโยงจากเปลือกไข่ชั้นในมาเปิดที่ชั้นนี้

3.3 เปลือกไข่ชั้นใน (mammillary layer) เป็นชั้นที่บางของเปลือก คือ 1 ใน 3 ของความหนาของเปลือกไข่ อยู่ติดกับเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอก ประกอบด้วยปุ่มพื้นเปลือกลักษณะหยาบๆ (mammilla) เป็นจำนวนมาก ปุ่มเหล่านี้ผ่นึกเป็นชั้นเดียวอยู่ติดกับเยื่อเปลือกไข่ ที่ปลายปุ่มไปเปิดออกที่เยื่อเปลือกไข่ชั้นใน จึงเป็นทางผ่านของอากาศให้กระจายไปทั่วเปลือกชั้นนี้ (ภาพที่ 2) โดยปุ่มพื้นเปลือกประกอบด้วยเกลือแร่ที่ไม่เป็นผลึกกระจายอยู่รอบผิวพื้น โปรตีนของเปลือก (granular matrix material)



ภาพที่ 2 เปลือกไข่ผ่าตามหน้าตัดด้านข้างขยายใหญ่จากของจริง

ที่มา: สุวรรณ (2529)

จากภาพขยายของเปลือกไข่ เริ่มลำดับจากด้านบนลงไปจะมีส่วนต่างๆ ดังนี้

1. เคลือบผิวไข่ (cuticle)
2. เปลือกชั้นนอก (spongy layer)
  - 2.1 ผิวพื้นเปลือก (mammillary knob or mammilla)

- 2.2 ปากรูพื้นเปลือก (mamillary core)
3. เปลือกชั้นใน (mamillary layer)
4. เยื่อเปลือกไข่ (shell membrane)

3.4 รูเปลือกไข่ (pore) เป็นรูเปิดบริเวณผิวเปลือกไข่มีลักษณะเป็นรูปร่างต่างๆ เชื่อมโยงจากภายนอกไข่เข้าไปต่อเชื่อมกับเปลือกชั้นใน (mamillary layer) ขนาดของรูเปลือกไข่ มีตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลาง 10-30 ไมครอน โดยธรรมชาติรูเปลือกไข่จะมีอยู่ประมาณ 7,500 รูต่อเปลือกไข่หนึ่งฟอง

องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของเปลือกไข่ ได้แก่ องค์ประกอบส่วนที่เป็นน้ำ 1.60 เปอร์เซ็นต์ และองค์ประกอบที่เป็นวัตถุแห้ง 98.40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งองค์ประกอบต่างๆ ที่อยู่ในเปลือกไข่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบต่างๆ ของเปลือกไข่

ชนิดขององค์ประกอบ	กรัม	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
1. น้ำ	0.1	1.60
2. วัตถุแห้ง	6.0	98.40
2.1 อินทรีย์วัตถุ	0.2	3.30
- โปรตีน	0.2	3.30
- ลิพิด	น้อยมาก	น้อยมาก
2.2 อนินทรีย์วัตถุ	5.8	95.10
รวม	6.1	100

ที่มา: สุวรรณ (2529)

#### 4. โครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่

เยื่อเปลือกไข่ของไข่ไก่เป็นสีชมพูอ่อน เพราะมีเม็ดสีพอฟิริน (porphyrin pigment) อยู่เล็กน้อย เยื่อเปลือกไข่เวลายังไม่แห้งจะอ่อนและเหนียว เวลาแห้งแล้วจะกรอบเปราะ เมื่อนำมาบดสามารถบดให้เป็นผงได้ ความเหนียวของเยื่อช่วยพยุงความเปราะของเปลือกไข่ไว้ ปริมาณของเยื่อ

เปลือกไข่อูระหว่าง 0.63-0.83 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนัก 0.36 กรัม หรือ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ของไข่ที่หนัก 58 กรัม หรือคิดเป็น 4-5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเปลือกไข่ทั้งฟอง (สุวรรณ, 2529)

เยื่อเปลือกไข่นี้มีประมาณ 4-5 เปอร์เซ็นต์ ของเปลือกทั้งฟอง ความหนาของเยื่อประมาณ 0.01-0.02 มิลลิเมตร เยื่อมี 2 ชั้น เยื่อชั้นนอกหนากว่าเยื่อชั้นใน (Tung and Richards, 1972; Wong *et al.*, 1984) ความหนาของเยื่อเปลือกไข่ขึ้นอยู่กับพันธุ์และขนาดของไข่ไก่ ขนาดของไข่ยิ่งเล็ก เยื่อนี้ก็จะยิ่งบาง ความหนาของเยื่อจะมีความหนาตามที่ด้านป้าน โดยด้านป้านมีความหนาของเยื่อประมาณ 0.069 มิลลิเมตร ด้านกลางหรือด้านข้างมีเยื่อหนาประมาณ 0.065 มิลลิเมตร และด้านแหลมมีเยื่อหนาประมาณ 0.057 มิลลิเมตร (สุวรรณ, 2529) มีรูพรุนที่ผิวจำนวนมาก เพื่อเป็นทางผ่านของอากาศ โดยเยื่อชั้นในมีรูพรุนมากกว่าเยื่อชั้นนอก (Board and Fuller, 1994; Tullet, 1987) เยื่อเปลือกไข่จะทำหน้าที่ควบคุมการกำหนดรูปร่างและองค์ประกอบของเปลือกไข่ (Arias *et al.*, 1991) โครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่มีความสำคัญในการจัดวางเชิงอุทกวิทยาโดยจับกันเป็นร่างแห ดังภาพที่ 3 เส้นใยเหล่านี้จะมีหมู่เอมีนซึ่งสามารถจับไอออนของโลหะหนักได้ เยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วยโปรตีนคอลลาเจน (มีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเยื่อเปลือกไข่แห้ง (King' ori, 2011)) เคราติน อีลาสติน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นเส้นใย (fiber) และองค์ประกอบอื่น คือ ออสติโอปอนติน (osteopontin) ไชอะโลโปรตีน (sialoprotein) ไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) กลูโคซามีน (glucosamine) คอนดรอยตินซัลเฟต (chondroitin sulfate) กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) และแซคคาไรด์อีกจำนวนเล็กน้อย จากการรายงานของ Okubo *et al.* (1997) พบว่า โปรตีนในเยื่อเปลือกไข่มีกรดแอมิโนฮิสติดีน (histidine) ซิสทีน (cystine) และโพรลีน (proline) ในปริมาณสูงกว่า แต่มีปริมาณไกลซีน (glycine) ต่ำกว่าโปรตีนของเปลือกไข่ และเยื่อเปลือกไข่มีปริมาณซิสทีนเป็นสองเท่าของเปลือกไข่ ดังปรากฏในตารางที่ 2 นอกจากนี้ Leach *et al.* (1981) และ Anwar (1990) พบว่าเดสโมซีน (desmosine) และไอโซเดสโมซีน (isodesmosine) เป็นกรดแอมิโนในอีลาสติน และอธิบายว่ากรดแอมิโนทั้งสองเป็นจุดที่เกิดพันธะเชื่อมข้าม (cross-link) ภายในโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ ที่เป็นเส้นใยทอประสานกันเป็นตาข่ายจำนวนมากแบบสุ่ม โดยเป็นเส้นใยที่มีความคงตัวและไม่ละลายน้ำ (Baker and Balch, 1962; Simons and Wiertz, 1963; Dong *et al.*, 2006)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบกรดแอมิโนของเปลือกผิวไข่และเยื่อเปลือกไข่

กรดแอมิโน <sup>1</sup>	เปลือกผิวไข่	เยื่อเปลือกไข่
กรดแอสพาร์ติก	8.51	8.67
ทรีโอนีน	5.75	6.04
ซีรีน	6.02	5.97
กรดกลูตามิก	11.92	13.56
ไกลซีน	9.65	6.19
อะลานีน	3.82	3.47
ซิสทีน	4.01	8.89
วาเลีน	3.49	6.75
เมทไทโอนีน	3.51	3.28
ไอโซลิวซีน	4.11	3.12
ลิวซีน	4.30	4.72
ไทโรซีน	4.81	2.31
ฟีนิลอะลานีน	2.22	2.54
ไลซีน	5.07	4.37
ฮิสติดีน	0.92	2.56
อาร์จินีน	6.01	6.87
โพรลีน	4.85	8.91

<sup>1</sup>กรดแอมิโน, กรัม/100 กรัม ตัวอย่างแห้ง

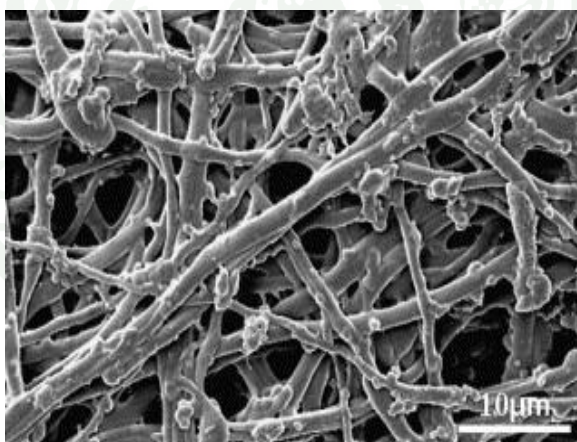
ที่มา: คัดแปลงจาก Okubo *et al.* (1997)

เยื่อเปลือกไข่แบ่งเป็น 2 ชั้น ได้แก่

4.1 เยื่อชั้นใน (egg membrane) อยู่ติดไข่ขาว มีผิวเรียบ บาง ความหนาประมาณ 2.7 ไมโครเมตร พบเส้นใยยาวมากกว่า 23 ไมโครเมตร เนื่องจากปลายเส้นใยที่เรียวแหลมจึงสามารถซ้อนเกย (overlap) รวมกับเส้นใยใกล้เคียงภายใต้ชั้นห่อหุ้มเดียวกัน เส้นใยมีเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่

สุด เท่ากับ 1.5 ไมโครเมตร เฉลี่ย 0.9 ไมโครเมตร เชื่อนี้ทำหน้าที่แยกไขขาวออกจากส่วนของเปลือก เรียกเชื่อนี้ในว่า “limiting membrane” (Board and Fuller, 1994; Tullet, 1987)

4.2 เยื่อชั้นนอก (shell membrane) อยู่ระหว่างเยื่อชั้นในกับเปลือกไข่ เยื่อชั้นในและชั้นนอกผนึกแน่นยกเว้นบริเวณด้านข้างของเปลือกไข่ เนื้อเยื่อทั้งสองแยกออกจากกันเป็นช่องอากาศของไข่ เยื่อชั้นนอก แบ่งออกเป็น 3 ชั้น แต่ละชั้นประกอบด้วยเส้นใยโปรตีนสานกันเป็นร่างแหซ้อนกันเป็นชั้นๆ ชั้นนอกสุดเป็นเส้นใยพวกเคราตินที่ไม่มีแฉกย่อย เส้นใยแต่ละเส้นมีลักษณะเป็นเส้นแบนๆ ขนาด 0.002-0.005 มิลลิเมตร อาจถึง 0.01 มิลลิเมตร เส้นใยจะมีปลอกหุ้มหนาประมาณ 0.5 ไมโครเมตร โดยเป็นสารพวกมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (mucopolysaccharide) (Tan *et al.*, 1992) เส้นใยชั้นกลางมีลักษณะเป็น 2 ชั้นย่อยๆ ที่แนบสนิทจนเกือบเป็นเนื้อเดียวกันและจะแยกให้ออกจากกันได้ยาก เส้นใยเหล่านี้เป็นพวกเคราตินกับมิวซินเส้นเล็กๆ ประสานกันเป็นร่างแหในแนวต่างๆ กัน คือ ขนานกับพื้นผิวไข่บ้าง ตั้งฉากกับบ้าง จึงทำให้เยื่อเปลือกไข่ชั้นนี้เหนียวขึ้น มีความหนาประมาณ 0.0148 มิลลิเมตร เยื่อแต่ละชั้นผนึกติดกันด้วยโปรตีนอัลบูมิน (albuminous cementing material) (สุวรรณ, 2529)



ภาพที่ 3 เส้นใยที่ทอประสานกันเป็นตาข่ายของเยื่อเปลือกไข่ในธรรมชาติ ตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้ FEI Sirion 200 field emission gun scanning electron microscope (FESEM)

ที่มา: Dong *et al.* (2006)

เยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วยสารอินทรีย์ 70 เปอร์เซ็นต์ สารอนินทรีย์ 10 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 20 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 3 สารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบหลัก คือ โปรตีน กับไขมัน

จำนวนเล็กน้อยและคาร์โบไฮเดรต โครงสร้างบางๆ ของเยื่อเปลือกไข่สร้างจากชั้นเส้นใยโปรตีน บางๆ ที่ไม่ละลายน้ำ เป็นร่างแหจำนวนมาก (สุวรรณ, 2529)

### ตารางที่ 3 องค์ประกอบต่างๆ ของเยื่อเปลือกไข่

ชนิดขององค์ประกอบ	กรัม	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
1. น้ำ	0.06	20.0
2. วัตถุแห้ง	0.24	80.0
2.1 สารอินทรีย์	0.21	70.0
- โปรตีน	0.21	70.0
2.2 สารอนินทรีย์	0.03	10.0

ที่มา: สุวรรณ (2529)

### 5. วิธีการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่

การแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่นั้นทำได้ยาก เนื่องจากเยื่อเปลือกไข่จะผนึกแน่นติดกับเปลือกไข่ (สุวรรณ, 2529) การทำให้เยื่อเปลือกไข่แยกออกจากเปลือกไข่ได้นั้นอาจใช้วิธีทางเคมีหรือวิธีทางกลในการแยก ตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวถึงวิธีการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ด้วยวิธีการต่างๆ มีดังนี้

วลัยพร และคณะ (2546) แยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ด้วยเครื่องแยก ซึ่งอาศัยหลักการลอยตัวในน้ำของเยื่อเปลือกไข่ โดยใช้แยกร่วมกับการใช้สารละลายกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ แช่เปลือกไข่ก่อนการแยก เปรียบเทียบกับการไม่แช่สารละลาย EDTA พบว่าเปลือกไข่ที่แช่ในสารละลาย EDTA สามารถแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ได้ง่าย และได้ปริมาณสูงกว่าทั้งนี้เนื่องจาก EDTA ทำให้เปลือกไข่ละลายหลุดจากเยื่อเปลือกไข่

ถิรเจต (2552) แยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ ด้วยเทคนิคการลอยแร่ โดยการใส่เครื่องลอยแร่ ซึ่งใช้น้ำที่ปริมาตรคงที่ที่ 2,000 มิลลิลิตร ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการลอยเยื่อเปลือกไข่ และใช้เปลือกไข่ 1,000 กรัม เมื่อเปิดเครื่องลอยแร่แล้วให้ทำการปรับค่าความเร็วรอบของเครื่อง

ให้มีความเร็วรอบต่ำ (900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 35 นาที) ช่วงหนึ่งเพื่อให้เยื่อเปลือกไข่เป็ยกน้ำ และเกิดการร้อนตัว จากนั้นทำการเพิ่มความเร็วยรอบในการหมุนที่สูงขึ้น (1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที) เพื่อให้เยื่อที่เริ่มเกิดการร้อนจัดสีกันเองหลุดออกจากเปลือกไข่ และจะมีการฟุ้งฟองอากาศเพื่อให้เยื่อที่หลุดออกจากเปลือกไข่ลอยขึ้นสู่ด้านบนเครื่องลอยแร่ แล้วทำการปาดเยื่อที่ลอยอยู่ออก โดยใช้ตะแกรงคัดขนาดเป็นตัวกรองไม่ให้เยื่อสูญหายไปก่อนการเทน้ำทิ้ง

Ishikawa *et al.* (1999) แยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ด้วยการแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อละลายเปลือกไข่ จากนั้นแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน

Vlad (2007) แยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ด้วยสารละลายกรดแอสซิติค โดยใช้พีเอชของสารละลายกรดแอสซิติคในช่วง 2.7-5.0 เพราะที่ช่วงพีเอชนี้จะช่วยรักษาโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ได้ดี ซึ่งการใช้สารละลายกรดแอสซิติคจะทำให้แยกเปลือกไข่จากเยื่อเปลือกไข่ได้โดยเปลือกไข่จะเปราะและแตกได้ง่าย และการจุ่มเยื่อเปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสซิติคจะทำให้คอลลาเจนพองตัว ลดเวลาในการสกัด นอกจากนี้ยังช่วยทำลายแบคทีเรียและเชื้อโรคที่อยู่ที่เปลือกไข่ได้

Tang *et al.* (2009) และ Tang *et al.* (2011) แยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ด้วยสารละลายกรดแอสซิติค เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกไข่สามารถละลายได้ในสารละลายกรดแอสซิติค โดยจุ่มไข่ทั้งฟองในสารละลายกรดแอสซิติค 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงแยกไข่ขาวและไข่แดงออก แล้วใช้น้ำปราศจากไอออนล้างให้สะอาด

Tang *et al.* (2010) แยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ด้วยสารละลายกรดแอสซิติค โดยจุ่มไข่ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 17.4 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงเปลือกจะหลุดแยกออก จากนั้นจึงแยกไข่ขาวและไข่แดงออก แล้วใช้น้ำปราศจากไอออนล้างเยื่อเปลือกไข่ให้สะอาด

## 6. การย่อยสลายโปรตีน (Protein hydrolysis)

การย่อยสลายโปรตีนเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการตัดแปร โครงสร้างของโปรตีนเพื่อให้โปรตีนเกิดสมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพดีขึ้น (สีกา, 2548)

โปรตีนเป็นส่วนประกอบในเนื้อสัตว์ เนื้อปลา เลือด ผลิตภัณฑ์นม และถั่วต่างๆ (Chervan and Deeslie, 1984) ผลผลิตจากการย่อยโปรตีน เรียกว่า โปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสต เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโปรตีน โดยการตัดสายเปปไทด์ที่มีสายโซ่ยาวให้เป็นกรดแอมิโนหรือเปปไทด์สายสั้นๆ (Howell, 1996) การเร่งปฏิกิริยาสามารถทำได้โดยการใช้กรด เบส หรือเอนไซม์ (วันชัย, 2545; Adler-Nissen, 1986)

วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมีและเอนไซม์

### 1. การย่อยด้วยสารเคมี

การย่อยด้วยสารเคมีเป็นวิธีการที่มีต้นทุนต่ำแบ่งย่อยออกเป็น 2 แบบ คือ การย่อยด้วยสารละลายกรดและการย่อยด้วยสารละลายเบส

#### 1.1 การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายกรด (acid hydrolysis)

การย่อยด้วยสารละลายกรดเป็นการย่อยโปรตีนเพียงบางส่วนเท่านั้น การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรด นิยมใช้กรดอินทรีย์ คือ กรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก แต่พบว่าเมื่อใช้กรดซัลฟูริกย่อยสลายโปรตีนจะทำให้โปรตีนมีกลิ่นไม่ดี และเมื่อทำให้เป็นกลางจะเกิดตะกอนของเกลือซัลเฟต ทั้งนี้เพราะซัลเฟตไอออนจะถูกแยกออกโดยการเติมเบเรียมไฮดรอกไซด์หรือแคลเซียมออกไซด์ซึ่งจะทำปฏิกิริยาให้เบเรียมซัลเฟตหรือแคลเซียมซัลเฟต และตะกอนดังกล่าวจะคุดซ์กรดแอมิโนหรือสารประกอบอื่นๆ ที่ได้จากการย่อยโปรตีน ดังนั้นจึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกมากกว่ากรดซัลฟูริก การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดมีข้อดี คือ สามารถทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายต่ำ และใช้เวลาสั้น วิธีนี้จึงนิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Gao *et al.*, 2006) แต่มีข้อเสีย คือ เกิดการสลายตัวของกรดแอมิโนทริปโตเฟน และในบางสภาวะกรดแอมิโนซิสทีน ซีรีน และเมทไธโอนีน อาจถูกทำลายด้วย

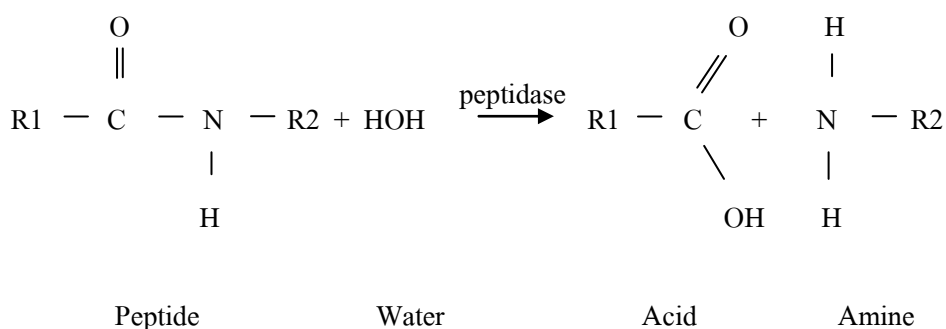
## 1.2 การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายเบส (alkaline hydrolysis)

เบสที่นิยมใช้ในการย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียไฮดรอกไซด์ สภาวะที่ใช้ทั่วไป คือ ใช้เบสเข้มข้น 4-5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4-8 ชั่วโมง การย่อยสลายด้วยเบสแม้กรดแอมิโนที่รีปโตเฟนจะถูกทำลายน้อย แต่กรดแอมิโนบางชนิดอาจเกิดเรซิไมเซชัน (racemization) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนกรดแอมิโนในรูป L-form ไปเป็นกรดแอมิโนในรูป D-form ที่ร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ได้ และยังทำให้กรดแอมิโนอาร์จินีน ทรีโอนีน และซิสทีนถูกทำลายด้วย นอกจากนี้ทำให้เกิดกลิ่นรสไม่ดี การย่อยสลายด้วยเบสจึงไม่เป็นที่นิยม

ปริมาณของกรดหรือเบสที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ยังหลงเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก จึงมีข้อจำกัดในการใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

## 2. การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis)

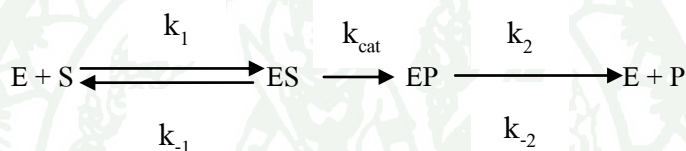
ปัจจุบันการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตนิยมใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์จะย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นและกรดแอมิโน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กระบวนการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

ที่มา: คัดแปลงจาก Randall *et al.* (1997)

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ให้อัตราการย่อยสลายค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับการใช้กรดและเบส เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงในการตัดพันธะเปปไทด์สูง โดยเป็นการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนด้วยน้ำ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยเปปไทด์สายใหม่ที่ได้จากการย่อยสลายสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ในการย่อยครั้งต่อไป (Adler-Nissen, 1993) กระบวนการย่อยสลายจะประกอบด้วยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อเนื่องกัน 3 ปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาแรกเกิดขึ้นจากการที่เอนไซม์ (E) จับกับสารตั้งต้น (S) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Michaelis (Michaelis complex, ES) ทำให้สารตั้งต้นเข้าสู่สภาพเปลี่ยนและมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจนกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-ผลิตภัณฑ์ (EP complex) จากนั้น EP จึงปล่อยผลิตภัณฑ์ (P) ออกมาทำให้เอนไซม์กลับมาเป็นอิสระ ซึ่งพร้อมจะเร่งปฏิกิริยาสลายสารตั้งต้นต่อไป ดังสมการในภาพที่ 5



E : enzyme, S : substrate, ES : enzyme-substrate complex, P : resulting peptides,

k: reaction velocity constants

ภาพที่ 5 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ที่มา: Adler-Nissen (1993)

## 7. สารรีดิวซิง

เนื่องจากในเนื้อเยื่อไม่มีกรดแอมิโนซิสเตอีน ซึ่งในโมเลกุลมีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ มีหมู่ซัลไฟไฮดริล (-SH) ที่สามารถรวมตัวกันระหว่างซิสเตอีนที่อยู่ภายในสายโพลีเปปไทด์เดียวกันหรือต่างสายกันเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ เกิดโครงสร้างที่มีการเชื่อมข้ามกันไปมาของพันธะไดซัลไฟด์จำนวนมาก พันธะนี้จะทำลายได้โดยใช้สารรีดิวซิง

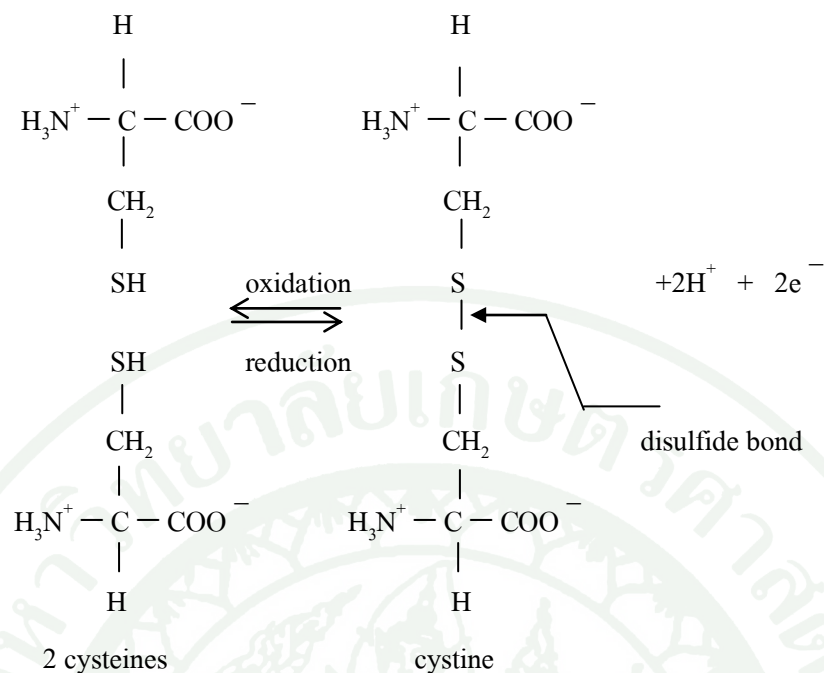
ไดซัลไฟด์ (disulfide linkage) เป็นพันธะที่แข็งแรงที่สุด ซึ่งเป็นพันธะโคเวเลนต์ โดยเป็นพันธะที่เกิดระหว่างซัลเฟอร์ที่เกิดจากการจับตัวกันของกรดแอมิโนซิสเตอีน 2 เรซิดิว ในโมเลกุล

โปรตีน ที่อาจจะอยู่ในสายเดียวกัน (intrachain) หรือต่างสายกัน (interchain) ของสายโพลีเปปไทด์ (เนตรนภิส, 2554) ดังภาพที่ 6

โดยทั่วไปพันธะไดซัลไฟด์ เป็นพันธะที่ทนต่อสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการทำลายสภาพธรรมชาติ (denature) ของโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามสามารถทำลายได้โดยสารรีดิวซิง เช่น แอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์ โมโนไฮดรต, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล, ไคโซไธริอิตอล (dithiothreitol) และกลูตาไธโอน เป็นต้น ซึ่งหลักการการทำงานของสารเหล่านี้จะคล้ายคลึงกัน คือ สารเหล่านี้จะลดพันธะโคเวเลนต์ โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้โครงสร้างของโปรตีนแตกออก (Benjakul *et al.*, 2005) เปลี่ยนพันธะไดซัลไฟด์ให้กลับเป็นหมู่ซัลฟไฮดริล (sulfhydryl groups)

Yi *et al.* (2004) รายงานว่าวิธีการที่จะทำให้ได้ soluble eggshell membrane protein (SEP) จากเยื่อเปลือกไข่ ทำได้โดยละลายเยื่อเปลือกไข่โดยใช้สารละลายกรด 3-เมอร์แคปโตโพรพิโอนิก ซึ่งแสดงสมบัติเป็นสารรีดิวซิงร่วมกับสารละลายกรดแอซีติกทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโครงสร้างระดับที่ 3 และ 4 ของโปรตีน

Benjakul *et al.* (2005) รายงานว่า แอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์ โมโนไฮดรต จะช่วยเพิ่มปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลพร้อมกับลดปริมาณพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน จึงทำให้สามารถทำลายโครงสร้างของโปรตีนได้



ภาพที่ 6 ลักษณะโครงสร้างของพันธะไดซัลไฟด์

ที่มา: เนตรนภิส (2554)

### 8. เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive peptides)

เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอาหารประเภทโปรตีน ประกอบด้วยกรดแอมิโนหลายชนิดเชื่อมต่อกัน โดยจะไม่แสดงสมบัติทางหน้าที่เมื่อเป็นหน่วยย่อย (fragment) อยู่ในโปรตีนต้นกำเนิด (parent protein) (Sarmadi and Amin, 2010) ในร่างกายคนและสัตว์จะมีการผลิตเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมีการสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ในรูปสารพรีโปรเปปไทด์ (prepropeptides) ขนาดใหญ่ จากนั้นจะเกิดการตัดแต่ง และปรับเปลี่ยนจนได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังมีการดูดซึมเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ จากการที่อาหารโปรตีนถูกย่อยในทางเดินอาหารอีกด้วย (Sharma *et al.*, 2011)

แหล่งของเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และ โปรตีนไฮโดรไลเสตสผลิตได้จากการสลายโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (Shimizu, 2012) ปกติเปปไทด์จะประกอบด้วยกรดแอมิโน 2-20 ชนิด และมี

มวลโมเลกุลน้อยกว่า 6,000 ดาลตัน ขณะที่โปรตีนประกอบด้วยกรดแอมิโนมากกว่า 20 ชนิด เปปไทด์และโปรตีนไฮโดรไลเสต อาจผลิตจากโปรตีนของสัตว์ พืช หรือจุลินทรีย์ โปรตีนจากสัตว์ เช่น นม เนื้อ หมู ปลา หรือไข่ โปรตีนจากพืช ได้จาก ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าว งา สาหร่าย และเห็ด และโปรตีนจากจุลินทรีย์ (Sarmadi and Amin, 2010) โดยมีการผลิตด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น การย่อยโดยใช้เอนไซม์ การหมักด้วยแบคทีเรีย และการย่อยโดยใช้เอนไซม์ที่แยกได้จากจุลินทรีย์ โดยปกติใช้เอนไซม์ เช่น เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน แพนกรีเอทิน และเทอร์โมไลซิน

เปปไทด์หลายชนิดที่ได้จากโปรตีนในอาหารจะแสดงสมบัติการเป็นแอนติออกซิแดนท์ เนื่องจากมีที่มาจากอาหารจึงมีความปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ และมีข้อดีบางประการเหนือกว่าเอนไซม์ในร่างกายที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ กล่าวคือ มีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อม และไม่เป็นอันตรายต่อระบบภูมิคุ้มกัน และยังให้คุณค่าทางโภชนาการ และ สมบัติทางหน้าที่อื่นๆ อีก ในการศึกษาผลต่อสุขภาพจะใช้ทั้งในรูปของโปรตีนไฮโดรไลเสต และส่วนของเปปไทด์ที่แยกออกมา ซึ่งไฮโดรไลเสตจะประกอบด้วย เปปไทด์และกรดแอมิโนรวมกันหลายชนิดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยกรด เบส หรือ จากกระบวนการหมัก (fermentation) ถ้าการย่อยโปรตีนทำโดยเอนไซม์ภายใน (endogenous enzyme) เช่น protease สิ่งที่ได้จากการย่อยจะเรียกว่า ออโตไลเสต (autolysate) แทนที่จะเรียกไฮโดรไลเสต (hydrolysate) แต่ส่วนของเปปไทด์ที่แยกออกมาจากโปรตีนไฮโดรไลเสต ก็คือ เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งประกอบด้วยกรดแอมิโนหลายชนิดเชื่อมต่อกัน (Sarmadi and Amin, 2010)

มีงานศึกษาในประเทศญี่ปุ่นระบุว่าเปปไทด์และโปรตีนไฮโดรไลเสตจากแหล่งต่างๆ กัน มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกในร่างกาย เช่น การควบคุมความดันเลือด ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ ช่วยบำรุงกระดูก ปรับปรุงเมตาบอลิซึมของไขมัน เป็นแอนติออกซิแดนท์ในเซลล์และเนื้อเยื่อ และปรับระบบภูมิคุ้มกัน (Shimizu, 2012)

เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจัดแบ่งตามหน้าที่ได้ดังนี้ (Shimizu, 2012)

#### 1. เปปไทด์ที่มีสมบัติต้าน โรคความดันโลหิตสูง (Antihypertensive peptides)

ความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยหลักที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ เปปไทด์จากการย่อยโปรตีนที่มาจากอาหาร เช่น ปลา เนื้อสัตว์ เมล็ดธัญพืช และสาหร่าย เป็นต้น จะ

ยับยั้งกิจกรรมของแองจิโอเทนซิน I คอนเวิร์ตติงเอนไซม์ (angiotensin-I-converting enzyme, ACE) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมความดันเลือด

## 2. เปปไทด์ที่ช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ (Mineral absorption-enhancing peptides)

เกลือแร่มีผลต่อโครงสร้างของกระดูก แคลเซียมเป็นแร่ธาตุหลักในโครงสร้างของกระดูก ซึ่งมีประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของแร่ธาตุในโครงกระดูก แคลเซียมจะมีความสมดุลได้ ขึ้นกับจำนวนของแคลเซียมในอาหาร และประสิทธิภาพในการดูดซึมแคลเซียมในลำไส้ อนุพันธ์ของเคซีน-ฟอสโฟไรเลทเปปไทด์ (casein-derived phosphorylated peptides) เคซีนฟอสโฟเปปไทด์ (casein phosphopeptides, CPP) ซึ่งผลิตขึ้นโดยการย่อยเคซีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน สามารถจับกับแร่ธาตุและละลายแร่ธาตุเหล่านั้นในอาหาร โดยเฉพาะแคลเซียม จึงดูดซึมภายในลำไส้ได้ดี

## 3. เปปไทด์ที่ช่วยลดระดับไขมันในเลือด (Blood lipid-lowering peptides)

กรดไขมันอิ่มตัวทำให้ระดับไขมันในซีรัมสูงขึ้น โดยจะรวมทั้งระดับไตรกลีเซอไรด์ และระดับไขมันที่ไม่ดีในเลือด (Low density lipoprotein หรือ LDL คอเรสเตอรอล) ระดับไขมันที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของกลุ่มคนในประเทศที่พัฒนาแล้ว มีการรายงานว่า โพรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลืองสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลได้ (Sugano *et al.*, 1988) โดยไฮโดรโพนิกเปปไทด์ในโพรตีนถั่วเหลืองจะไปจับกับกรดน้ำดีจากตับอ่อนเป็นตัวช่วยในการย่อย กระบวนการนี้ทำให้เกิด LDL เมื่อย่อยแล้วจะถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดไหลเวียนไปทั่วร่างกายก่อนจะถูกส่งไปถึงตับเพื่อสร้างพลังงาน

## 4. เปปไทด์ที่ช่วยในการปรับระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulating peptides)

ระบบภูมิคุ้มกันจะป้องกันร่างกายให้ต่อต้านสารพิษและเชื้อโรค โดยการปรับให้มีการปล่อยไซโตไคน์ (cytokines) ซึ่งจะกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมในมาโครฟาจ และจะผลิตแอนติบอดี ซึ่ง Immunomodulating peptides ที่ได้มาจากเคซีนและโพรตีนเวย์ พบว่าจะช่วยเสริมหน้าที่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ดีขึ้น โดยจะเพิ่มเซลล์ภูมิคุ้มกัน สังเคราะห์แอนติบอดี และการควบคุมไซโตไคน์ โดยเปปไทด์จะถูกปล่อยออกมาในระหว่างการหมักนมด้วยแบคทีเรียที่ย่อยกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ซึ่งพบว่าเปปไทด์เหล่านี้จะปรับให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ ควบคุมการผลิตไซโตไคน์

(cytokines) และกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมการย่อยอาหารในเซลล์ (phagocytic) ของมาโครฟาจ (Korhonen and Pihlanto, 2006)

### 5. เปปไทด์ที่มีสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (Anti-oxidant peptides)

การสร้างพลังงานโดยใช้ออกซิเจน (oxidative metabolism) เกิดขึ้นภายในเซลล์ทำให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งจะถูกกำจัดโดยเอนไซม์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ไดสมิวเทส (superoxide dismutase), คตะเลส (catalase) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เป็นต้น แต่ถ้าเกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากเกินศักยภาพของระบบ ก็จะเกิดผลเสียต่อเซลล์ และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้ เปปไทด์หลายชนิด เช่น เปปไทด์จาก โปรตีนนม ถั่วเหลือง เป็นต้น แสดงสมบัติเป็นแอนติออกซิเดนท์หรือสารต้านอนุมูลอิสระ Sarmadi and Amin (2010) รายงานผลของเปปไทด์จากถั่วเหลืองในการลด paraquat (PQ)-induced oxidative stress ในหนูทดลอง สารแอนติออกซิเดนท์สามารถจับอนุมูลอิสระ และยับยั้งปฏิกิริยาการออกซิไดส์ไขมันทั้งแบบใช้และไม่ใช้เอนไซม์ จึงน่าที่จะศึกษาถึงการทำหน้าที่เหล่านี้ในร่างกายมนุษย์ (Sharma *et al.*, 2011)

### 9. การใช้ประโยชน์จากเยื่อเปลือกไข่

เปลือกไข่เป็นวัสดุเหลือทิ้งที่หาได้ง่ายและมีปริมาณมาก ซึ่งในเปลือกไข่จะมีเยื่อเปลือกไข่ที่มีองค์ประกอบเป็นโปรตีนจำนวนมาก เช่น คอลลาเจน คีราติน เป็นต้น (สุวรรณ, 2529) จึงมีการศึกษาการนำเยื่อเปลือกไข่มาใช้ประโยชน์ เช่น การสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กรดอินทรีย์ และตรวจสอบคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดได้จากเยื่อเปลือกไข่ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยในด้านอื่นๆ เช่น การใช้เยื่อเปลือกไข่ในการกำจัดโลหะหนักในน้ำเสียจากโรงงาน การศึกษาวิธีการเตรียม โปรตีนเยื่อเปลือกไข่ที่ละลายได้ (soluble egg shell membrane protein, SEP) จากเยื่อเปลือกไข่ โดยการใช้เอนไซม์เปปซินเพื่อช่วยในการย่อยพันธะเปปไทด์ในเยื่อเปลือกไข่ และศึกษาความสามารถของ SEP ในการเร่งให้เกิดการขึ้นรูปใหม่ของคอลลาเจน และศึกษาสมบัติการต้านแบคทีเรีย และการเสื่อมสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradability) ของ SEP โดยการทำเป็นฟิล์มเพาะเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาวิธีการสกัด โพลีเปปไทด์จากเยื่อเปลือกไข่ และการนำเยื่อเปลือกไข่มาใช้ในการศึกษาทางการแพทย์โดยนำเยื่อเปลือกไข่ซึ่งมีไกลโคซามิโนไกลแคนและโปรตีนที่จำเป็นมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับการรักษาข้อต่อของกระดูกและเนื้อเยื่อ

เกี่ยวพัน โดยการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ และนำไปผ่านการย่อยสลาย มีรายละเอียดของงานวิจัยต่างๆ ดังนี้

วลัยพร และคณะ (2546) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กรดอินทรีย์ มีการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ด้วยเครื่องแยกซึ่งอาศัยหลักการลอยตัวในน้ำของเยื่อเปลือกไข่ โดยแช่เปลือกไข่ในถังที่ควบคุมขนาดให้คงที่เติมสารละลายกรดเอททิลีนไดเอมีนเทตระแอซิดิก (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนระหว่างเปลือกไข่ต่อสารละลาย EDTA เป็น 1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แปรปริมาณเปลือกไข่ที่ใช้แยกเป็น 300, 500, 700, 900 และ 1,100 กรัม เปรียบเทียบกับเปลือกไข่ที่ไม่ได้แช่ พบว่าการแช่เปลือกไข่ด้วย EDTA 5 เปอร์เซ็นต์ ช่วยแยกเปลือกไข่ออกมามากกว่าเปลือกไข่ที่ไม่ได้แช่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และปริมาณเปลือกไข่ที่สามารถแยกเยื่อเปลือกไข่ออกมาได้มากที่สุด คือ 500 กรัม เนื่องจากไม่มีเปลือกไข่ไปกีดทับเยื่อเปลือกไข่ เยื่อเปลือกไข่จึงลอยขึ้นมาบนผิวหน้าของสารละลายได้ ต่อมาศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้สารละลายกรดเอซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยแปรอัตราส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อกรดอินทรีย์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนี้คือ 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 นำไปเขย่าผสมในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดคอลลาเจนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าที่อัตราส่วน 1:8 สามารถสกัดคอลลาเจนออกมามากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) การใช้สารละลายกรดเอซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ สกัดคอลลาเจนได้ 507 และ 495 มิลลิกรัมต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัม ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ชนิดของคอลลาเจนที่สกัดได้จากเยื่อเปลือกไข่ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเป็นคอลลาเจน Type I ซึ่งประกอบด้วยสาย  $\alpha 1$  และ  $\alpha 2$

อุดมรัตน์ (2550) ศึกษาความสามารถของเปลือกไข่และเยื่อเปลือกไข่ในการกำจัดเศษชะวาลินซ์โครเมียมในสารละลายเพื่อนำไปใช้ในการกำจัดโลหะหนักในน้ำเสียจากโรงงาน โดยใช้เปลือกไข่ เยื่อเปลือกไข่ และเปลือกไข่รวมเยื่อเปลือกไข่ พบว่า เยื่อเปลือกไข่มีประสิทธิภาพดีที่สุดเนื่องจากมีพื้นที่ผิวมากที่สุด และมีหมู่เอมีนที่เป็นประจุบวก ซึ่งจับได้โครเมตไอออนที่เปลี่ยนแปลงเป็นประจุลบในช่วงพีเอช 4-6 เปลือกไข่มีประสิทธิภาพต่ำสุดเพราะว่ามีพื้นที่ผิวน้อยกว่า และเปลือกไข่รวมเยื่อเปลือกไข่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าเยื่อเปลือกไข่ไม่มากนัก แต่เมื่อคำนึงถึงความสะดวกในการนำมาใช้งานจึงควรเลือกใช้เปลือกไข่รวมเยื่อเปลือกไข่ซึ่งมีอัตราส่วนตามธรรมชาติ (36:1) เป็นวัสดุดูดซับ

Takahashi *et al.* (1996) ศึกษาวิธีการเตรียมโปรตีนเยื่อเปลือกไข่ที่ละลายได้ (soluble egg shell membrane protein, SEP) จากเยื่อเปลือกไข่ โดยนำเยื่อเปลือกไข่ 1 กรัม ผสมกับกรดเพอร์ฟอมิกปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ได้จากการผสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับกรดเพอร์ฟอมิกปริมาตร 90 มิลลิลิตร) ซึ่งย่อยพันธะไดซัลไฟด์ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วย กรวยแก้ว (glass filter) ภายใต้สุญญากาศ จากนั้นล้างเยื่อเปลือกไข่ด้วยน้ำ และละลายในกรดแอสติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน 3,200 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จำนวน 10 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติมเปปสเททิน (pepstatin) 0.2 มิลลิกรัม ก่อนกรองเพื่อแยกน้ำออก และทำแห้งโดยการไลโอไฟไลซ์ ซึ่งผู้วิจัยอธิบายว่าการที่เยื่อเปลือกไข่ไม่สามารถละลายได้ มีสาเหตุหลักมาจากพันธะไดซัลไฟด์ภายในและระหว่างโมเลกุลของโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ การย่อยพันธะไดซัลไฟด์จะทำให้เยื่อเปลือกไข่ละลายได้มากขึ้น ซึ่งเยื่อเปลือกไข่ไม่สามารถละลายด้วยกรดเพอร์ฟอมิกเพียงอย่างเดียว เนื่องจากยังมีพันธะเชื่อมข้ามชนิดอื่นๆ ดังนั้น จึงเพิ่มเอนไซม์เปปซิน เพื่อช่วยในการย่อยพันธะเปปไทด์ในเยื่อเปลือกไข่ ผลการย่อยจะได้เป็น โปรตีนเยื่อเปลือกไข่ที่ละลายได้ (soluble egg shell membrane protein, SEP) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณ SEP ที่ได้จากการทดลองที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25 และ 4 องศาเซลเซียส เป็น 32-39 เปอร์เซ็นต์ และ 16-24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถของ SEP ในการเร่งให้เกิดการขึ้นรูปใหม่ของคอลลาเจน โดยละลาย pepsin-solubilized collagen (PSC) ที่เตรียมจาก insoluble pig skin collagen แล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เติม SEP และปล่อยให้เกิดการขึ้นรูปของคอลลาเจน ซึ่งวัดได้จากการนำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่า SEP สามารถเร่งให้เกิดการขึ้นรูปใหม่ของคอลลาเจนด้วยการจัดเรียงโมเลกุลใหม่ที่เป็นระเบียบ และสามารถลดการสลายตัวใหม่อีกครั้งของคอลลาเจนภายใต้สภาวะของตัวทำละลายต่างๆ

Yi *et al.* (2003) ศึกษาวิธีการเตรียมโปรตีนเยื่อเปลือกไข่ที่ละลายได้ (soluble egg shell membrane protein, SEP) จากเยื่อเปลือกไข่ เพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติ โดยนำเยื่อเปลือกไข่ดิบ 0.6 กรัม ละลายในกรด 3-เมอร์แคปโตโพรพิโอนิกความเข้มข้น 1.25 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายกรดแอสติกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง นำสารผสมให้ความร้อน และเก็บที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเอาของแข็งที่ไม่ละลายออก สารละลายส่วนใสปรับพีเอชเท่ากับ 5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ นำตะกอนสีขาวที่ได้จากการกรอง ล้างด้วยเมทานอล และทำให้แห้ง จะได้ SEP ซึ่ง SEP สามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ง่าย โดยเตรียม SEP

ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายกรดแอสซิดิก 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปั่นสารละลายลงบน สไลด์แก้ว และนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ฟิล์มบางๆ ที่ได้มีสมบัติไม่ละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ และเมื่อนำไปตรวจสอบโครงสร้างระดับจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) พบว่าที่พื้นผิวของฟิล์ม SEP เรียบและเป็นเนื้อเดียวกัน เหมาะสำหรับเป็นวัสดุที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมทางชีวภาพ เพราะจากการทดลองพบว่าเซลล์ของ NIH3T3 ซึ่งเป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากหนูพันธุ์ Swiss albino (Swiss mouse embryo fibroblast) สามารถเกาะติดที่ผิวของฟิล์ม SEP ได้ดี

Vlad (2007) ศึกษาวิธีการสกัดโพลีเปปไทด์จากเยื่อเปลือกไข่ โดยแยกเยื่อเปลือกไข่ด้วยสารละลายกรดแอสซิดิก ซึ่งกรดแอสซิดิกทำให้เปลือกไข่เปราะและแตกง่ายจึงแยกเปลือกไข่จากเยื่อได้ และการจุ่มเยื่อเปลือกไข่ในกรดแอสซิดิกจะทำให้คอลลาเจนพองตัว ลดเวลาในการสกัด นอกจากนี้ยังช่วยทำลายแบคทีเรียและเชื้อโรคที่อยู่ที่ยเปลือกไข่ได้ จากนั้นนำเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดแอมิโน และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น คอลลาเจน กลูโคซามีน คอนดรอยติน กรดไฮยาลูโรนิก นำเยื่อเปลือกไข่ไปทำแห้งโดยใช้การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า (เพราะอุณหภูมินี้จะทำให้โครงสร้างแบบเกลียวของคอลลาเจนสลายตัว และคอลลาเจนจะถูกสกัดออกมาได้ง่าย) นำเยื่อเปลือกไข่ไปบดแล้วหมักซึ่งในกระบวนการหมักจะย่อยคาร์โบไฮเดรตในเยื่อเปลือกไข่ ทำให้แยกโปรตีนได้ ในกระบวนการหมักจะใช้ inoculums ของยีสต์ รา หรือแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris* เป็นต้น หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังการหมัก สกัดแยกเอาโพลีเปปไทด์หรือองค์ประกอบอื่นๆ ตามที่ต้องการ ซึ่งผลิตภัณฑ์ของกระบวนการหมักเยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ คอลลาเจน อย่างน้อยหนึ่งชนิดหรือหลายชนิด กรดไฮยาลูโรนิก กลูโคซามีน และกรดแอมิโนชนิดต่างๆ เช่น ไลซีน ลิวซีน ทริปโตเฟน ซีสทีน เป็นต้น นำคอลลาเจนที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีการจับกับสีย้อม (โดยใช้สารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 ในสารละลายกรดได้สีเขียว ทำปฏิกิริยากับโปรตีน แล้วโปรตีนจะจับกับสีย้อมเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน) เพื่อวิเคราะห์ acid soluble collagen พบว่าสารสกัดมีคอลลาเจน 27 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และศึกษาขนาดโมเลกุลของคอลลาเจน โดยใช้ Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 130-140 กิโลดาลตัน

Yi *et al.* (2007) ศึกษาสมบัติการต้านแบคทีเรีย และการเสื่อมสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradability) ของ SEP ซึ่ง SEP ผลิตโดยวิธีของ Yi *et al.* (2003) นำไปเปรียบเทียบกับ raw egg shell membrane (raw ESM) และ autoclaved egg shell membrane

(autoclaved ESM) นำมาทดสอบคุณสมบัติการต้านแบคทีเรีย โดยนำฟิล์ม SEP, raw ESM และ autoclaved ESM ชนิดละประมาณ 50 มิลลิกรัม ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วสเตอร์ไรส์ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที ทำให้แห้ง แล้วจุ่มฟิล์มแต่ละชนิดในสารละลายอีโคไล (*Escherichia coli*) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 2 ชั่วโมง นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วสเปรดบนเพลท เพื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า raw ESM สามารถลดจำนวนแบคทีเรียลงได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ SEP และ autoclaved ESM สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้เพียงเล็กน้อย จากนั้นนำฟิล์มแต่ละชนิดมาทดสอบการสลายตัวด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยเติมสารละลายเอนไซม์ทริปซิน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีฟิล์ม SEP, raw ESM และ autoclaved ESM ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ที่มีการเขย่าร่วมด้วย จากนั้นนำฟิล์มมาล้างน้ำกลั่น ทำให้แห้งในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักเพื่อประเมินการสลายตัว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในช่วง 3 วันแรก ทั้ง 3 ตัวอย่างสูญเสียน้ำหนักอย่างรวดเร็วและมีอัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้น และเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน ยังมีการสูญเสียน้ำหนัก และมีอัตราการสลายตัวอยู่ แสดงให้เห็นว่าทั้ง ESM และ SEP สามารถสลายตัวได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

Ruff *et al.* (2009) ได้นำเยื่อเปลือกไข่ธรรมชาติ (Natural Eggshell Membrane, NEM®) มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งได้จากการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ และผ่านการย่อยสลายด้วยกระบวนการที่มีการจดลิขสิทธิ์ไว้ และนำมาทำให้แห้งเป็นผง จะได้ผงเยื่อเปลือกไข่ธรรมชาติ (NEM®) ที่บริสุทธิ์ ซึ่งมีไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) และโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการรักษาข้อต่อของกระดูกและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งศูนย์การศึกษาทางคลินิกของมนุษย์ (ประเทศสหรัฐอเมริกา) ได้ดำเนินการประเมินประสิทธิภาพ และความปลอดภัยของ NEM® สำหรับรักษาความเจ็บปวดและความไม่ยืดหยุ่นที่เกี่ยวกับข้อต่อของกระดูกและความผิดปกติของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยได้ทำการทดลอง ใช้ผู้ป่วยสองกลุ่ม คือ กลุ่ม single-arm trial จำนวน 11 คน และ double-arm trial 28 คน โดยให้ NEM® 500 มิลลิกรัม วันละครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วัดผลโดยประเมินการเปลี่ยนแปลงของความเจ็บปวดทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการรักษาข้อต่อ/พื้นที่ (ทั้ง 2 กรณีศึกษา) การพิจารณา single-arm trial ในช่วงของการเคลื่อนไหว (range of motion, ROM) และ ROM ที่เกี่ยวข้องกับความเจ็บปวดจะนำมาใช้ในการประเมิน ซึ่งผลการตอบสนองต่อการรักษาจะสิ้นสุดที่ 7 และ 30 วัน ทั้งนี้การประเมินผลทางคลินิก ได้ดำเนินการเกี่ยวกับ intent-to-treat (ITT) population ในการศึกษาแต่ละครั้ง ซึ่งพบว่า Single-arm trial ที่ได้รับอาหารเสริมด้วย NEM® จะมีการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญ ในการรักษาที่เวลา 7 วัน (เพิ่มขึ้น 27.8 เปอร์เซ็นต์,  $P = 0.038$ ) และ 30 วัน สำหรับความเจ็บปวดทั่วไป (ลดลง 72.5 เปอร์เซ็นต์,  $P = 0.007$ ) และความยืดหยุ่น (เพิ่มขึ้น 43.7 เปอร์เซ็นต์,  $P = 0.006$ ) และความเจ็บปวดที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหว (ลดลง 75.9

เปอร์เซ็นต์,  $P = 0.021$ ) และการศึกษา Double-arm trial ซึ่งได้รับอาหารเสริมด้วย NEM® จะมีการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญต่อการรักษาที่ 7 วันสำหรับการรักษาแขนทั้งสองข้าง (X: ลดลง 18.4 เปอร์เซ็นต์;  $P = 0.021$  Y: ลดลง 31.3 เปอร์เซ็นต์;  $P = 0.014$ ) ไม่มีความแตกต่างทางคลินิกระหว่างการรักษาแขนที่เวลา 7 วัน การตอบสนองต่อการรักษาอย่างมีนัยสำคัญอย่างต่อเนื่อง ถึง 30 วัน สำหรับการรักษาความเจ็บปวด (ลดลง 30.2 เปอร์เซ็นต์;  $P = 0.0001$ ) ไม่มีการรายงานผลที่ตรงกันข้ามในระหว่างการศึกษา และมีรายงานว่า การรักษาได้รับการยอมรับเป็นอย่างดีจากผู้เข้าร่วมการศึกษา จากการศึกษานี้นักวิจัยได้สรุปว่า เชื้อเปลือกไข่ธรรมชาติ (NEM®) มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นตัวเลือกใหม่ในการรักษาที่มีประสิทธิภาพ และปลอดภัยสำหรับรักษาอาการเจ็บปวด และความยืดหยุ่นที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของข้อต่อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การรับประทานอาหารเสริมด้วย NEM® 500 mg วันละครั้ง จะช่วยลดความเจ็บปวดอย่างมีนัยสำคัญอย่างรวดเร็ว (7 วัน) และต่อเนื่องกัน (30 วัน) นอกจากนี้ ความหมายทางคลินิก จากการวิเคราะห์ผลการตอบสนองแสดงให้เห็นว่า ส่วนของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษามีผลอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจจะมาจากประโยชน์ที่ได้รับจากการเสริม NEM® ซึ่งช่วยรักษาอาการบาดเจ็บได้มาก

Zhao and Chi (2009) ได้ทำการค้นคว้าและตรวจสอบคุณลักษณะของคอลลาเจนที่สกัดได้จากเชื้อเปลือกไข่ ซึ่งสกัดคอลลาเจนออกมาโดยใช้วิธี acid-pepsin digestion โดยแช่เชื้อเปลือกไข่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเชื้อเปลือกไข่ด้วยน้ำปราศจากไอออนเย็นจนเป็นกลาง แล้วนำมาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำส่วนที่ย่อยได้มาหมุนเหวี่ยงที่ 10000g เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนใสและตะกอนล้างด้วยกรดแอสซิดิก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 3 ครั้ง และกรองผ่าน fritted disk funnel จากนั้นเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์จนได้ความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ เพื่อแยกคอลลาเจนออกโดยการตกตะกอน กวนผสมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยง (10000g 45 นาที) นำตะกอนมาละลายในกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และไดอะไลซ์ด้วยกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ กรดแอสซิดิกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และน้ำปราศจากไอออน ตามลำดับ แล้วนำมาตรวจสอบคุณลักษณะของคอลลาเจน โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดแอมิโน ผลการทดลองพบว่ามีไกลซีนเป็นองค์ประกอบโดยทั่วไป 30.27 เปอร์เซ็นต์ ในคอลลาเจนจากเชื้อเปลือกไข่ ศึกษารูปแบบของหน่วยย่อยของเปปไทด์ที่เป็นส่วนประกอบโดยวิธี SDS-PAGE ผลการทดลองพบว่า คอลลาเจนจากเชื้อเปลือกไข่ประกอบด้วยสายแอลฟา ( $\alpha$ ) ที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 สาย และเป็นคอลลาเจน type I ประกอบด้วยสาย  $\alpha_1$  และสาย  $\alpha_2$  การศึกษา Fourier Transforms Infrared (FTIR) spectroscopy เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับที่ 2 ของคอลลาเจน ซึ่งพบว่ายังคงรักษาโครงสร้าง

เกลียว 3 สายของคอลลาเจนไว้ได้เป็นอย่างดี โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยพบพิกของ amide A เกี่ยวข้องกับ NH ที่มีการยึดออกเป็นคู่กับพันธะไฮโดรเจน amide B เกี่ยวข้องกับ CH<sub>2</sub> ที่มีการยึด ออกแบบไม่สมดุล amide II เกี่ยวข้องกับการโค้งงอของ NH และการยึดของ CN amide III เกี่ยวข้องกับการยึดออกของ CN และ NH และเกี่ยวข้องกับการโครงสร้างเกลียว 3 สายของคอลลาเจน และการศึกษา Differential Scanning Calorimetry (DSC) เป็นการศึกษาอุณหภูมิการสลายตัว (denaturation temperature, T<sub>d</sub>) ของคอลลาเจนของเยื่อเปลือกไข่ที่สามารถใช้เป็นตัวชี้ของ การประเมินความคงตัวของคอลลาเจน type I จากเยื่อเปลือกไข่ ซึ่งถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้น พันธะไฮโดรเจน ภายในคอลลาเจนจะสลายตัวเพิ่มขึ้น สุดท้ายจะทำให้โครงสร้างเกลียว 3 สายของคอลลาเจนที่ พันธะไฮโดรเจนรักษาไว้เปลี่ยนโครงสร้างเป็น random coil ของเจลาติน โดยอุณหภูมิในการ สลายตัวของคอลลาเจน type I ของเยื่อเปลือกไข่ประมาณ 55.10 องศาเซลเซียส

## 10. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากเศษวัสดุเหลือทิ้ง

จากการที่อุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารมีการขยายตัวมากขึ้น ปริมาณการบริโภคอาหาร ภายในประเทศและการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศมีจำนวนสูง ทำให้อุตสาหกรรมเหล่านี้ต้อง ประสบปัญหาเกี่ยวกับการจัดการกับเศษวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูป ซึ่งเศษวัสดุเหลือทิ้ง เหล่านี้ ได้แก่ เครื่องในปลา โครงกระดูกไก่ เศษเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิ อันได้แก่ หัว เครื่องใน ก้าง ครีบและหนังปลา เป็นต้น โดยเปลือกไข่ก็เป็นเศษวัสดุเหลือทิ้งชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ยังมี เศษ วัสดุเหลือทิ้งที่เป็นของเหลวที่ได้จากกระบวนการฆ่าสัตว์ เช่น เลือด ซึ่งแต่เดิมนั้นจะนำเศษวัสดุ เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาแนวทางการนำ เศษ วัสดุเหลือทิ้งมาทำให้เกิดประโยชน์ และเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่เศษวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ โดยการ นำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น โปรตีนไฮโดรไลส เป็นต้น

โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการนำเศษวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปมาผลิตเป็นโปรตีน ไฮโดรไลส ดังนี้

สุปราณี (2539) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสโดยใช้หัวและไส้ปลาทรายแดงเพื่อ ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแพงเฟอร์เตอร์หมู โดยหัวและไส้ปลาทรายแดงมี ปริมาณโปรตีนมาก ควรนำไปใช้ประโยชน์ให้คุ้มค่า และเมื่อนำวัตถุดิบไปบดและอบแห้งในตู้อบ แห้งแบบถาด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ องค์ประกอบทางเคมีพบว่าประกอบด้วยโปรตีน 49.92 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 6.85 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน

9.32 เเปอร์เซ็นต์ เถ้า 31.12 เเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และจากองค์ประกอบทางเคมีข้างต้น พบว่า มีความใกล้เคียงกับองค์ประกอบของโปรตีนปลาเข้มข้น (fish protein concentrate) ตามข้อกำหนดของ Ockerman (1992) ซึ่งกำหนดไว้ว่าโปรตีนปลาเข้มข้นประกอบด้วย โปรตีน 50-77 เเปอร์เซ็นต์ ความชื้น 6-12 เเปอร์เซ็นต์ ไขมัน 5-15 เเปอร์เซ็นต์ เถ้า 8-33 เเปอร์เซ็นต์ และเส้นใยน้อยกว่า 1 เเปอร์เซ็นต์

สุภาวดี (2542) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวปลาทูน่าโดยใช้หัวปลาทูน่าพันธุ์โอแถบซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋อง ซึ่งมีปริมาณ โปรตีน 57.33 เเปอร์เซ็นต์ ไขมัน 24.46 เเปอร์เซ็นต์ และเถ้า 18.07 เเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง โดยนำวัตถุดิบมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยสลายเท่ากับ 58 มีกรดแอมิโนที่เหมาะสม และมีรสขมน้อย จึงนำมาผลิตเป็นซอสปรุงรสสูตรซอสหอยนางรม และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโปรตีนเท่ากับ 68.11 เเปอร์เซ็นต์

รุ่งอรุณ (2545) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตไขมันต่ำจากของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ โดยการกำจัดไขมันออกจากหัวและไส้ปลาทรายแดงสด ใช้วิธีการล้างน้ำที่สภาพพีเอช 5.5 ในอัตราส่วนระหว่างหัวและไส้ปลาสดต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) ล้าง 2 ครั้ง และวิธีการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เเปอร์เซ็นต์ โดยสกัด 1 ครั้ง จากนั้นนำมาผลิตเป็นโปรตีนปลาไฮโดรไลเสต เพื่อใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส เมื่อนำมาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความเข้มข้นของกลิ่นคาวปลาและตรวจวัดปริมาณไขมันในโปรตีนปลาไฮโดรไลเสต พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเสตเหลวที่ได้จากการย่อยสลายหัวและไส้ปลาทรายแดงที่ผ่านการสกัดไขมันด้วยเอทานอลมีความเข้มข้นของกลิ่นคาวปลาและปริมาณไขมันต่ำ โดยมีปริมาณไขมัน 0.08 เเปอร์เซ็นต์

มนฤทัย (2551) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโครงไก่ด้วยเอนไซม์ โดยเริ่มจากการเตรียมน้ำซุปลงจากโครงไก่ โดยใช้สารละลายเกลือ ในอัตราส่วน โครงไก่ต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 2:1 ใช้อุณหภูมิในการสกัด 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำน้ำซุปลงสกัดมาด้วยเอนไซม์อัลคาเลส แล้วนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไปกรองด้วยไมโครฟิลเตรชัน เมมเบรนเพื่อแยกของแข็ง คอลลอยด์ ไขมัน สิ่งสกปรกต่างๆ รวมถึงโปรตีนโมเลกุลใหญ่เพื่อให้ได้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ประกอบด้วยโปรตีนโมเลกุลเล็ก เปปไทด์ และกรดแอมิโน จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ พบกรดแอมิโนที่จำเป็น 10 ชนิด ได้แก่ อาร์จินีน ฮิสทีดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมทไธโอนีน ฟีนิลอะลานีน ทรี

โอนีน ทริปโตเฟน และวาเลีน มีค่า 18.77, 63.36, 94.8, 225.13, 561.15, 62.26, 206.9, 23.2, 7.1 และ 80.27 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ

Suetsuna (2000) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อกุ้งด้วยเอนไซม์โปรติเอส จำนวน 10 ชนิด คือ amano S (*Bacillus* sp.) newlase F (*Rhizopus niveus*) proleather (*Bacillus* sp.) biopraxe PN4 (*Bacillus subtilis*) denazyme AP (*Aspergillus oryzae*) molsin F (*Aspergillus saitoi*), pronase (*Streptomyces griseus*) bromelin F (pineapple) pepsin (porcine stomach mucosa) และเอนไซม์ pancreatin (porcine stomach mucosa) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากเอนไซม์ amano S newlase F proleather denazyme AP bromelin F pepsin และ pancreatin มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าโทโคเฟอรอล โดยเอนไซม์เปปซินที่ใช้ในการย่อยโปรตีนจากเนื้อกุ้ง แสดงกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

Sathivel *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากเนื้อปลาด้วยการย่อยของเกลือใช้จากอุตสาหกรรมประมงประกอบด้วยเครื่องใน หัวและก้างปลาด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) โดยใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีน และใช้สภาวะการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 8 ทำการย่อยนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน นำโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงและนำส่วนสารละลายไปทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้มีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิโนลิกได้น้อยกว่าโทโคเฟอรอล บิวทิลเลท ไฮดรอกซีนิโซล (butylated hydroxyanisole, BHA) และบิวทิลเลท ไฮดรอกซีโทลูอิน (butylated hydroxytoluene, BHT) 0.5 เท่า โดยโทโคเฟอรอล BHA และ BHT มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ 86.6 95.6 และ 94.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Je *et al.* (2005) ศึกษาการย่อยก้าง หัว และหางปลาคอด (alaska pollack frame) ด้วยเอนไซม์จากลำไส้ของปลาทุ (mackerel intestine crude enzyme) ทำการย่อยโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อซับสเตรท 50 : 1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าพีเอชที่ 10 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไฮโดรไลสที่ได้มาผ่านอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้เมมเบรนที่มี molecular weight cut off 30, 10, 5, 3 และ 1 กิโลดาลตัน โดยนำส่วนที่ผ่านอัลตราฟิลเตรชันในแต่ละชั้นมาทำให้แห้งโดยวิธีการทำให้อยู่ในสภาพผงแห้ง (lyophilized) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด โดยโปรตีนไฮโดรไลสที่ผ่านอัลตราฟิลเตรชัน ขนาด 10 5 และ 1 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิโนลิกได้ดีกว่าวิตามินอี โดยโปรตีน

ไฮโดรไลเซสที่ผ่านอัลตราฟิลเตรชัน molecular weight cut off ขนาด 1 กิโลดาลตัน มีประสิทธิภาพ  
ดีที่สุด



## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. วัตถุดิบ

1.1 เปลือกไข่ จากไก่พันธุ์ช้ำ บราวน์ (Isa brown) ได้รับความอนุเคราะห์จากร้าน เซ็นทรัลเบเกอรี่

#### 2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการแยกเชื้อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่

2.1.1 เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง (รุ่น GT 4100 ยี่ห้อ Ohaus)

2.1.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath ยี่ห้อ Memmert)

2.1.3 เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

2.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter รุ่น Microcomputer pH-vision 6071, Jenco Electronics Limited)

2.1.5 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

2.1.6 อุปกรณ์เครื่องครัว

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการเตรียม โปรตีน ไฮโดรไลสได้จากเชื้อเปลือกไข่

2.2.1 หม้อควบคุมอุณหภูมิภายใต้สภาวะความดัน (gas retort)

2.2.2 เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง (รุ่น GT 4100 ยี่ห้อ Ohaus)

2.2.3 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเชื้อเปลือกไข่ที่แยกได้ และโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเชื้อเปลือกไข่

- 2.3.1 ไมโครมิเตอร์ ขนาด 0-25 มิลลิเมตร (Vernier caliper: 60123467, Mitutoyo Corporation, Japan)
- 2.3.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter รุ่น Microcomputer pH-vision 6071, Jenco Electronics Limited)
- 2.3.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven ยี่ห้อ Memmert, Schwach, Germany)
- 2.3.4 เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle furnace ยี่ห้อ Gallenkamp รุ่น FSE 621, UK)
- 2.3.5 เครื่องวิเคราะห์โปรตีนแบบ Kjeldahl (ยี่ห้อ BÜCHI รุ่น 435: digestion, BÜCHI รุ่น B-316: distillation unit, Labortechnik AG, Switzerland)
- 2.3.6 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (ยี่ห้อ Tecator รุ่น Soxtec System HT 1043: Extraction Unit, UK)
- 2.3.7 เครื่องวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีน (SDS-PAGE รุ่น Mini-protein II Electrophoresis Cell และ Power supply, Bio-Rad Laboratory)
- 2.3.8 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo รุ่น Genesis 10-s, TherMo Electron Corporation., Madison, USA)
- 2.3.9 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 2.3.10 เครื่องเหวี่ยงแยก (Junior centrifuge ยี่ห้อ Gallenkamp, England)
- 2.3.11 เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง (รุ่น GT 4100 ยี่ห้อ Ohaus)
- 2.3.12 เครื่องชั่งวิเคราะห์ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance รุ่น Analytical Plus ยี่ห้อ Ohaus)
- 2.3.13 ถ้วยอะลูมิเนียม (Aluminium can)
- 2.3.14 ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (Crucible)
- 2.3.15 เครื่องปั่นผสมของเหลว (Vortex mixer รุ่น VX 100 จากบริษัท Labnet International, Inc, USA)
- 2.3.16 ไมโครปิเปต (ยี่ห้อ Pipette Man, Gilson S.A.S.)
- 2.3.17 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Leica, model DME)
- 2.3.18 กล้องจุลทรรศน์แสงเลเซอร์แบบส่องกราด (Confocal Laser Scanning Microscope หรือ CLSM รุ่น LSM5 PASCAL จากบริษัท Carl Zeiss Pte จำกัด)
- 2.3.19 เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer รุ่น Multistirrer 6, Velp scientific, Italy)
- 2.3.20 สไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์ (cover glass)
- 2.3.21 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

### 3. สารเคมี

#### 3.1 สารเคมีสำหรับการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่

3.1.1 กรดแอซีติก (glacial acetic acid;  $\text{CH}_3\text{COOH}$ : Merck KGaA, Germany)

#### 3.2 สารเคมีสำหรับการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่

3.2.1 กรดแอซีติก (glacial acetic acid;  $\text{CH}_3\text{COOH}$ : Merck KGaA, Germany)

3.2.2 ซิสเทอีน (L-Cysteine hydrochloriden Monohydrate,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ : Analytical grade: Fluka, Switzerland)

3.2.3 2- เมอร์แคปโทเอทานอล (2-Mercaptoethanol,  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ : Amersham Biosciences, Sweden)

3.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงเลเซอร์แบบส่องกราด (Confocal Laser Scanning microscope)

3.3.1 สารละลายฟลูออเรสซิน ไอโซไทโอไซยานาต (Fluorescein isothiocyanate, (FITC) ความเข้มข้น 0.00015 เปอร์เซ็นต์ (Sigma-Aldrich, USA)

#### 3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนวิธีลาวรี่ (Lowry's method)

3.4.1 โฟลิน-ซีโอคาลเทอ (Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent: Analytical grade: Sigma-Aldrich, USA)

3.4.2 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate anhydrous,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : Analytical grade: Rankem, India)

3.4.3 โบวายเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin: Fluka, Switzerland)

3.4.4 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper (II) sulfate,  $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ : Analytical grade Fisher Chemical, UK)

3.4.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide,  $\text{NaOH}$ : Analytical grade: Merck, Germany)

3.4.6 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรด (Potassium sodium – tartrate,  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : Analytical grade: UNIVAR, APS Ajax Finechem, Australia)

### 3.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนวิธีเจดาห์ล (Kjeldahl method)

3.5.1 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : Analytical grade: Merck, Germany)

3.5.2 โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulphate,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ : Analytical grade: Ajax Finechem)

3.5.3 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper (II) sulfate,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : Analytical grade: Fisher Chemical, UK)

3.5.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide,  $\text{NaOH}$ : Commercial grade)

3.5.5 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : Commercial grade)

3.5.6 กรดบอริก (Boric acid,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : Analytical grade: Ajax Finechem)

3.5.7 เมทิลเรด (Methyl Red,  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ : Analytical grade: Panreac, Panreac Quimica Sa, Spain)

3.5.8 โบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol Green,  $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ : Analytical grade : LABCHEM, Ajax Finechem)

3.5.9 เอทานอล (Ethanol,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ : Analytical grade: Merck, Germany)

### 3.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไขมัน

3.6.1 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether: Analytical grade: Fisher Chemical, UK)

### 3.7 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของโปรตีน

3.7.1 โปรตีนมาตรฐาน (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range: Bio-Rad Laboratories)

3.7.2 เมทานอล (Methanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ : Analytical grade: Merck, Germany)

3.7.3 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate:  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ : ACS Reagent grade: USB Corporation, Japan)

3.7.4 กรดแอซีติก (Acetic acid:  $\text{CH}_3\text{COOH}$ : Analytical grade: Merck, Germany)

3.7.5 อะคริลาไมด์ เพจ (Acrylamide PAGE,  $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ : Amersham Biosciences, Sweden)

3.7.6 เมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ (Methylenebisacrylamide,  $\text{CH}_2\text{CHCONH})_2\text{CH}_2$ : Amersham Biosciences, Sweden)

3.7.6 ไกลซีน (Glycine,  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ : MB grad: Plus One USB Corporation, USA)

3.7.7 2- เมอร์แคปโทเอทานอล (2-Mercaptoethanol,  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ : Amersham Biosciences, Sweden)

3.7.8 โซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ : USB Corporation, USA)

3.7.9 คูแมสซึ่บริลเลียนบลู อาร์-250 (Coomassie brilliant blue R-250,  $\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2\text{Na}$ : USB Corporation, USA)

3.7.10 N,N,N',N'-เตตระเมทิลเอทิลีนไดอะมีน (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED),  $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ : MB grade: USB Corporation, USA)

3.7.11 โบร โมฟีนอลบลู (Bromophenol blue,  $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ : Ajax Finechem)

3.7.12 ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล อะมิโนมีเทน (Tris (hydroxymethyl aminomethane),  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ : MB grade: USB Corporation, USA)

3.7.13 กลีเซอรอล (Glycerol,  $\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$ : Analytical grade: Asia Pacific Specialty Chemicals Limited)

## วิธีการ

### 1. การแยกเยื่อเปลือกไข่จากเปลือกไข่

#### 1.1 การเตรียมตัวอย่างเปลือกไข่ก่อนการแยกเยื่อเปลือกไข่

ไข่เปลือกไข่ไก่พันธุ์ช็อค บราวน์ (Isa brown) ซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งจากร้านทำเบเกอรี่ นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ ไข่ปรุงรสเพื่อขจัดสิ่งสกปรก เช่น ดิน ทราาย เป็นต้น ที่ติดอยู่ที่ผิวเปลือกด้านนอก สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 30 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส โดยเก็บไม่เกิน 1 สัปดาห์ นำเปลือกไข่มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อจากเปลือก

#### 1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่

นำเปลือกไข่ที่ล้างทำความสะอาดแล้วมาบอบพอให้เปลือกแตก นำมาแช่ในสารละลายกรดแอซิดิก โดยใช้อัตราส่วนเปลือกไข่ต่อสารละลายกรดแอซิดิก 1:16 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ไข่ไข่จำนวน 10 ฟองต่อหนึ่งสภาวะในการแยกเยื่อเปลือกไข่ (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ) จัดสภาวะในการแยกเยื่อเปลือกไข่ โดยใช้ น้ำกลั่นหรือสารละลายกรดแอซิดิกความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์ อุณหภูมิในการแช่ 28, 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาประเมินการแยกเยื่อเปลือกไข่และเปลือกไข่ออกจากกัน โดยการสังเกตระดับการหลุดร่อนของเปลือกไข่ออกจากเยื่อเปลือกไข่ที่สภาวะต่างๆ กัน โดยให้ระดับคะแนน 1-3 ดังคำอธิบายต่อไปนี้ (ใช้ผู้ประเมิน 1 คน)

- 1 คือ เปลือกไข่หลุดร่อนออกจากเยื่อเปลือกไข่ได้ยาก (มีเปลือกไข่หลุดร่อนประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์)
- 2 คือ เปลือกไข่หลุดร่อนออกจากเยื่อเปลือกไข่ได้ปานกลาง (มีเปลือกไข่หลุดร่อนประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์)
- 3 คือ เปลือกไข่หลุดร่อนออกจากเยื่อเปลือกไข่ได้ง่าย (มีเปลือกไข่หลุดร่อนประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์)

จากนั้นลอกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ กรณีเยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอซิดิกต้องนำมาล้างด้วยน้ำ จนค่าพีเอชของน้ำที่ล้างเท่ากับน้ำเริ่มต้นที่ใช้ล้าง

เยื่อเปลือกไข่ที่ได้ทั้งหมดนำมาวางบนตะแกรงจนสะเด็ดน้ำ ประมาณ 30 นาที นำไปประเมินลักษณะทางกายภาพโดยวัดความหนาและความนุ่มหยุ่น เปรียบเทียบกับเยื่อเปลือกไข่ที่แยกโดยไม่ผ่านการแช่เปลือกไข่ในสารละลายใดๆ ดังนี้

1.2.1 การวัดความหนาของเยื่อเปลือกไข่หลังแช่ในสารละลายด้วยไมโครมิเตอร์ โดยวัดเยื่อที่อยู่บริเวณกลางฟองไข่จำนวน 3 ตำแหน่ง เพื่อดูการพองตัวของเยื่อเปลือกไข่หลังแช่ในสารละลาย

1.2.2 การตรวจประเมินลักษณะเนื้อสัมผัสของเยื่อเปลือกไข่ เพื่อประเมินความนุ่มหยุ่น โดยบดขยี้เยื่อเปลือกไข่ระหว่างนิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ รวมถึงการใช้แรงฉีกเยื่อเปลือกไข่ด้วยมือ โดยการประเมินจากผู้ทำการทดลอง 1 คน โดยให้ระดับคะแนนต่างๆ ดังนี้

1.2.2.1 การพองตัวและนุ่มหยุ่น

- 1 คือ ไม่พองตัวและไม่นุ่มหยุ่น (ใช้แรงในการบดขยี้มาก)
- 2 คือ มีการพองตัวและนุ่มหยุ่นปานกลาง (ใช้แรงในการบดขยี้ปานกลาง)
- 3 คือ มีการพองตัวและนุ่มหยุ่นมาก (ใช้แรงในการบดขยี้น้อย)

1.2.2.2 การใช้แรงฉีกให้ขาด

- 1 คือ ใช้แรงมากในการฉีกให้ขาด (ฉีกให้ขาดได้ยาก)
- 2 คือ ใช้แรงปานกลางในการฉีกให้ขาด
- 3 คือ ใช้แรงน้อยในการฉีกให้ขาด (ฉีกให้ขาดได้ง่าย)

สภาวะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่ เลือกจากการที่เปลือกไข่หลุดร่อนออกจากเยื่อเปลือกไข่ได้ง่ายเป็นประเด็นที่สำคัญที่สุด นอกจากนั้นเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้ควรแสดงถึงการพองตัว (ความหนา) นุ่มหยุ่น (ใช้แรงในการบดขยี้น้อย) และฉีกขาดง่าย

นำเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้จากสภาวะการทดลองที่เหมาะสม คือ เยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้โดยการแช่ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง) นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส โดยเก็บไม่เกิน 4 สัปดาห์ เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

## 2. การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีและกายภาพของเยื่อเปลือกไข่

เปรียบเทียบเยื่อเปลือกไข่ที่แยกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำกับเยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแยกเยื่อโดยแช่ในสารละลายกรดแอสซิติค โดยวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพต่างๆ ดังนี้

### 2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อเปลือกไข่

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้โดยการแช่ในสารละลายกรดแอสซิติค (ESMA) (ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง) เปรียบเทียบกับเยื่อเปลือกไข่ที่แยกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) ซึ่งเตรียมโดยนำเปลือกไข่จำนวน 50 ฟอง มาแช่น้ำเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ เป็นเวลา 30 นาที แล้วใช้มือคั้นลอกเยื่อออกจากเปลือกไข่ จากนั้นนำเยื่อเปลือกไข่มาบดด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็วระดับ 3 เป็นเวลา 2 นาที โดยหลังปั่นผสมเยื่อเปลือกไข่จะมีขนาดเฉลี่ย 0.3 เซนติเมตร ส่วนเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้โดยใช้สารละลายกรดแอสซิติค ใช้ไข่จำนวน 50 ฟอง แยกด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 1.2 นำเยื่อเปลือกไข่มาบดเช่นเดียวกับ ESMW จากนั้นนำ ESMW และ ESMA ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมันและเถ้า ตามวิธีของ AOAC (2000) (ภาคผนวก ก) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ได้จากการคำนวณ โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} + \text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} + \text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} + \text{เปอร์เซ็นต์เถ้า})$$

2.2 การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยและการศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของเยื่อเปลือกไข่

นำเยื่อเปลือกไข่สดที่ได้จากการแยกเยื่อหลังจากแช่เปลือกไข่ในน้ำเป็นเวลา 30 นาที และเยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแยกออกจากเปลือกไข่หลังแช่ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0.5 หรือ 1.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตัดด้วยมีดผ่าตัด ให้เป็นชิ้นขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร นำมาเชื่อมสีตามวิธีของ Liong *et al.*(1997) โดยใช้สารละลายสีย้อมซึ่งเตรียมโดยละลายฟลูออเรสซินไอโซไซยาเนต (fluorescein-5-isothiocyanate, FITC) 15 มิลลิกรัมในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.5 M เจือจางสารละลายสี 100 เท่าก่อนนำไปใช้ แช่เยื่อเปลือกไข่ในงานแก้วที่มีสารละลายสีย้อมในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินโดยใช้น้ำกลั่นไหลผ่านตัวอย่างจนไม่เห็นสีย้อมละลายปนออกมากับน้ำกลั่น ใช้เวลาล้างสีประมาณ 30 วินาที นำชิ้นตัวอย่างวางบนสไลด์แก้วซับน้ำส่วนเกินด้วยกระดาษกรอง (filter paper) ปิดทับชิ้นตัวอย่างด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วทาน้ำยาทาเล็บ เพื่อกันกระจกปิดสไลด์เลื่อนหลุด เก็บตัวอย่างไม่ให้ถูกแสง และไม่เก็บตัวอย่างมากกว่า 7 วัน ศึกษาโครงสร้างด้วยกล้องแสงเลเซอร์แบบส่องกราด (confocal laser scanning microscope, CLSM (model LSM5 PASCAL, ZEISS, Germany)) ใช้แหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ชนิด Helium-Neon (He-Ne) กระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ความยาวคลื่น (excitation wavelength) 488 นาโนเมตร ซึ่ง FITC จะปล่อยแสงที่ความยาวคลื่น 500-530 นาโนเมตร ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 20 เท่า เก็บภาพตัวอย่างและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยในเยื่อเปลือกไข่ และรายงานค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยจำนวน 50 เส้น

### 3. การศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่

#### 3.1 ผลของชนิดสารรีดิวซิงและอุณหภูมิในการไฮโดรไลซ์

เยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแยกเยื่อด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 1 นำมาตัดให้เป็นชิ้นขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร และยาว 0.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักเยื่อเปลือกไข่ 1.5 กรัม นำไปย่อยในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่เติมแอลกอฮอล์ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (C) หรือ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (M) หรือไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 หรือ 120 องศาเซลเซียส (ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) ทำการย่อยสลายเป็นเวลา 8 ชั่วโมง (เนื่องจากถ้าใช้เวลากการย่อยสลายที่น้อยกว่า 8 ชั่วโมง เยื่อเปลือกไข่ที่อยู่ในสารละลายจะยังมีลักษณะเป็นชิ้น แต่ชิ้นเยื่อเปลือกไข่นั้นจะเริ่มใส แสดงว่าอาจจะเริ่มมีการย่อยสลายเกิดขึ้น แต่ระยะเวลาการย่อยสลายยังน้อยเกินไป จึงเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลายนานขึ้นเป็น 8 ชั่วโมง) และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1448g เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วน

ใสมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 บันทึกน้ำหนักส่วนใสที่กรองได้ ซึ่งสารละลายที่ได้คือโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ โดยบรรจุโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ โดยวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลส ดังนี้

### 3.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้

นำส่วนใสซึ่งเป็นโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ 5 กรัม อบอุ่นไล่ความชื้นที่ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักของแข็งที่เหลืออยู่ คำนวณเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ในไฮโดรไลส วิธีการคำนวณดังภาคผนวก ข

### 3.1.2 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลได้

คำนวณดังสูตรข้างล่างนี้

$$\text{ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็งที่ละลายได้ในส่วนใสทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักของแข็งในเยื่อ 1.5 กรัม ก่อนย่อย}} \times 100$$

3.1.3 การตรวจสอบโครงสร้างระดับจุลภาคของส่วนของแข็งในโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ โดยนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ หยดบนสไลด์แก้ว ปิดทับตัวอย่างด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วทาน้ำยาทาเล็บ เพื่อกันกระจกปิดสไลด์เลื่อนหลุด ศึกษาโครงสร้างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Leica model DME) สำหรับสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า และสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส (ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 และ 40 เท่า วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคที่พบในโปรตีนไฮโดรไลส ที่กำลังขยาย 40 เท่าของเลนส์วัตถุ จำนวน 100 อนุภาค

สำหรับเยื่อเปลือกไข่ที่ถูกลูไฮโดรไลซ์เป็นโปรตีนไฮโดรไลสที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส (ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลสเพิ่มเติม ดังนี้

### 3.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเชื้อเปลือกไข่

เจือจางสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเชื้อเปลือกไข่ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 4.5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเชื้อเปลือกไข่ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี (Lowry's method) (Lowry *et al.*, 1951) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ค โดยปริมาณโปรตีนคิดเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโบวเยอร์เอ็มอัลบูมิน

### 3.1.5 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดย sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970)

นำโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเชื้อเปลือกไข่มาเจือจางด้วยสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร ทำอเล็กโทรโฟริซิสในเจลส่วนบน (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และเจลส่วนล่าง (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยสีคูแมสซีบริลเลียนบลู อาร์-250 (Coomassie brilliant blue R-250) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากการเปรียบเทียบกับ Broad range marker (Bio-Rad No.161-0363, USA) วิธีการทำอเล็กโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE แสดงดังภาคผนวก ง

เลือกสภาวะของสารรีดิวซิง และอุณหภูมิที่มีผลต่อการเพิ่มความสามารถในการละลายของเชื้อเปลือกไข่ ในการพัฒนาโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเชื้อเปลือกไข่

## 4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเชื้อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ (ข้อ 1.2) ใช้แผนการทดลองแบบ 4 x 4 x 3 factorial in CRD (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ) (ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1 และ 1.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 4 ระดับ คือ 28, 45, 60, และ 70 องศาเซลเซียส และเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 17)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อเปลือกไข่ที่แยก โดยการแช่เปลือกไข่ในน้ำ และเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้โดยใช้กรดแอสซิติคภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเยื่อเปลือกไข่ (ข้อ 2) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (ข้อ 3.1.1) การวัดขนาดอนุภาคที่พบในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต (ข้อ 3.1.3) และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเยื่อเปลือกไข่ (ข้อ 3.1.4) (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยใช้ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 17)

## 5. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเคมี ห้องปฏิบัติการแปรรูป และห้องปฏิบัติการวิจัยปริญญาโทของภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

## 6. ระยะเวลาการทำการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2554-กันยายน 2556

## ผลและวิจารณ์

### 1. สถานะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่

การแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ไก่พันธุ์ช่า บราวน์ (Isa brown) ศึกษาโดยใช้ไข่ไก่ขนาด 65 กรัมต่อฟอง ซึ่งเปลือกไข่มีน้ำหนักประมาณ 6.8 กรัม เนื่องจากเปลือกไข่มีส่วนของไข่ขาวและสิ่งสกปรกอื่นๆ ติดอยู่ จึงนำเปลือกไข่ล้างน้ำทำความสะอาด แล้วสะเด็ดน้ำให้แห้ง เป็นเวลา 30 นาที ดังภาพที่ 7 (ก) นำมาบิบบนอุ้งมือเบาๆ เพื่อให้เปลือกแตกแต่ยังไม่หลุดจากเยื่อเปลือกไข่ ดังภาพที่ 7 (ข) จากนั้นจึงแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสซิติค โดยใช้อัตราส่วนเปลือกไข่ต่อสารละลายกรดแอสซิติค 1:16 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภาพที่ 7 (ค) ที่ความเข้มข้น อุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ กัน โดยใช้สารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 โมลาร์ ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 28, 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยภาพที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเปลือกไข่ที่แช่ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ จากนั้นส้อมเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้ดังภาพที่ 7 (ง) ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อทดสอบความนิ่มหยุ่นของเยื่อเมื่อถูกไปมาระหว่างนิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ และการฉีกขาดของเยื่อเปลือกไข่เมื่อฉีกด้วยมือ วัดความหนา และวัดพีเอชของสารละลายที่แช่เปลือกไข่ ได้ผลดังตารางที่ 4 และ 5



(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 7 การแยกเยื่อเปลือกไข่ (ก) เปลือกไข่ (ข) เปลือกไข่ที่บิบบให้แตก (ค) เปลือกไข่แช่ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้นต่างๆ และ (ง) เยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของเปลือกไข่ที่แช่ในสารละลายกรดแอซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา (ก) 24 ชั่วโมง (ข) 48 ชั่วโมง และ (ค) 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 ระดับการหลุดร่อนของเปลือกไข่ออกจากเยื่อเปลือกไข่และการตรวจประเมินลักษณะของเยื่อเปลือกไข่ที่แช่ในสารละลายที่สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน

ชนิดของ สารละลาย	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเปลือกที่ หลุดแยกจากเยื่อ	เนื้อสัมผัสเยื่อเปลือกไข่	
				ความนุ่มหยุ่น	การฉีกขาด
น้ำ	28	24	1	1	1
		48	1	1	1
		72	1	1	1
	45	24	1	1	1
		48	1	1	1
		72	1	1	1
	60	24	1	1	1
		48	1	1	1
		72	1	1	1
70	24	1	1	1	
	48	1	1	1	
	72	1	1	1	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิดของ สารละลาย	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเปลือกที่ หลุดแยกจากเชื้อ	เนื้อสัมผัสเชื้อเปลือกไข่	
				ความนิ่มหยุ่น	การฉีกขาด
กรดแอซีติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	28	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
	45	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
	60	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
	70	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์	28	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
	45	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
	60	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
	70	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3

ตารางที่ 4 (ต่อ)

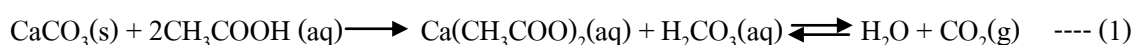
ชนิดของ สารละลาย	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเปลือกที่ หลุดแยกจากเยื่อ	เนื้อสัมผัสเยื่อเปลือกไข่	
				ความนิ่มหยุ่น	การฉีกขาด
กรดแอสซิติค ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	28	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
	45	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
	60	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3
	70	24	1	1	1
		48	2	2	2
		72	3	3	3

ประเมินจากผู้ทำการทดลอง 1 คน ระดับคะแนน 1 = น้อย 2 = ปานกลาง และ 3 = มาก

จากตารางที่ 4 ระดับคะแนน 1, 2 และ 3 หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเยื่อเปลือกไข่ที่พบอยู่ในระดับน้อย ปานกลาง และมาก ตามลำดับ พบว่าการแช่เปลือกไข่ในน้ำไม่ช่วยในการแยกของเยื่อออกจากเปลือกไข่และไม่พบความแตกต่างเมื่อใช้อุณหภูมิแตกต่างกัน เนื่องจากเปลือกไข่มีองค์ประกอบของอนินทรีย์สาร ซึ่งไม่ละลายน้ำ ได้แก่ ผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) ซึ่งมีประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังมีแมกนีเซียมและฟอสฟอรัสอีกจำนวนเล็กน้อย (Etches, 1996) ดังนั้น เยื่อเปลือกไข่จึงคงสภาพใกล้เคียงกับก่อนนำมาแช่น้ำ โดยเปลือกยังเกาะติดกับเยื่อเปลือกไข่ ซึ่งเยื่อมีความเหนียวและฉีกขาดได้ยาก

เมื่อแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสซิติค ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 28, 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า กรดแอสซิติคเมื่อสัมผัสกับเปลือกไข่ ทำให้สีเคลือบผิวไข่เริ่มหลุดร่อนออกจากเปลือกไข่เป็นคราบสีน้ำตาล จากการที่เปลือกไข่ประกอบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) ปริมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ (Hincke *et al.*, 2000; Mine

*et al.*, 2008; Cordeiro and Hincke, 2011) จึงทำปฏิกิริยากับกรด ดังสมการที่ (1) เกิดเป็นแคลเซียมอะซิเตต ( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) และกรดคาร์บอนิก ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) ซึ่งกรดคาร์บอนิกแตกตัวได้คี่ที่สภาวะกรด เกิดเป็นน้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จึงทำให้เกิดเป็นฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากเปลือกไข่ลอยขึ้นมาที่ผิวหน้าของสารละลาย ทำให้เกิดลักษณะคล้ายฟองโฟม



การเกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้เกิดแรงดันซึ่งจะดันเปลือกไข่ให้เคลื่อนที่ และหลุดร่อนออกจากเยื่อ ส่วนแคลเซียมไอออนจะลอยอยู่ในสารละลายกรดแอซิดิก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงข้างต้นจะทำให้เปลือกไข่บางลง และแตกง่าย (Verdenius and Alma, 1958; Nys *et al.* 2004; Vlad, 2007) เปลือกไข่จึงเปราะแตกและหลุดร่อนออกจากเยื่อเปลือกไข่ตกลงที่ก้นภาชนะดังภาพที่ 8

โดยการแช่ในสารละลายกรดแอซิดิกความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิในการแช่ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง สารละลายกรดแอซิดิกที่แช่ขุ่นขาว เปลือกไข่หลุดร่อนออกจากเยื่อ ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เปลือกไข่บางส่วนเปราะเป็นชิ้นเล็กๆ มีลักษณะคล้ายตะกอนสีขาว เยื่อที่ได้จากสภาวะนี้ เยื่อจะเหนียวโดยไม่หลุดแยกเมื่อถูไปมาระหว่างนิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ และฉีกให้ขาดได้ยาก (เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มทดลองจะใช้แรงมากที่สุดในการฉีกให้ขาด) เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เปลือกไข่เปราะมากขึ้น และหลุดร่อนออกจากเยื่อมากขึ้น โดยสังเกตเห็นเปลือกไข่หลุดร่อนออกจากเยื่อเปลือกไข่ประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ เยื่อนี้ม้วนกลาง เมื่อใช้แรงขยี้เพียงพอเยื่อจะหลุดเป็นชิ้นเล็ก ฉีกให้ขาดได้ง่ายขึ้น และเมื่อเวลา 72 ชั่วโมง เปลือกไข่ส่วนใหญ่หลุดร่อนออกมาจากเยื่อ และเยื่อลอยอยู่ด้านบน ส่วนเปลือกไข่จมอยู่ที่ก้นภาชนะ โดยเปลือกไข่หลุดร่อนออกจากเยื่อเปลือกไข่ประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ เยื่อนี้ม้วนมาก เมื่อใช้แรงขยี้เล็กน้อย ก็หลุดเป็นชิ้นเล็ก ฉีกให้ขาดได้ง่ายมาก โดยภาพที่ 9 แสดงลักษณะของเยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแยกออกจากเปลือกไข่มีลักษณะปรากฏสีขาวอมชมพู ผลของอุณหภูมิในการแช่ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีการประเมินไม่มีความละเอียดเพียงพอ



(ก)

(ข)

(ค)

**ภาพที่ 9** เยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา (ก) 24 (ข) 48 และ (ค) 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสซิดิก อุณหภูมิ และเวลาในการแช่เปลือกไข่เพื่อแยกเยื่อเปลือกไข่ ต่อค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้ จัดแผนการทดลองแบบ  $4 \times 4 \times 3$  แฟกทอเรียลในการสุ่มสมบูรณ์ โดยปัจจัยความเข้มข้นของกรดแอสซิดิกเท่ากับ 4 ระดับคือ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์ ปัจจัยของอุณหภูมิในการแช่กรดเท่ากับ 4 ระดับคือ 28, 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส และปัจจัยของเวลาในการแช่กรดเท่ากับ 3 ระดับคือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาในการแช่ไม่มีผลต่อค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้ แต่ความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสซิดิกและอุณหภูมิในการแช่มีผลต่อค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) นอกจากนี้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสซิดิก กับระยะเวลาที่แช่ในกรด และปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสซิดิก ระยะเวลา และอุณหภูมิ ทำให้เยื่อเปลือกไข่มีค่าความหนาแตกต่างกันด้วย (ตารางผนวกที่ จ1) จากตารางที่ 5 เมื่อแช่เปลือกไข่ในน้ำ (สารละลายกรดแอสซิดิกที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0 โมลาร์) ได้เยื่อเปลือกไข่ที่มีความหนาน้อยกว่าแช่ในสารละลายกรดแอสซิดิกที่ความเข้มข้น 0.5-1.5 โมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) แสดงว่าสารละลายกรดแอสซิดิกมีผลทำให้เกิดการสลายพันธะภายในโครงสร้างของโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ ส่งผลให้น้ำแทรกตัวเข้าไปภายในโครงสร้างได้ เยื่อเปลือกไข่จึงเกิดการพองตัว แต่ถ้าเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสซิดิก 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์ โดยจัดแผนการทดลองแบบ  $3 \times 4 \times 3$  แฟกทอเรียลในการสุ่มสมบูรณ์ กลับพบว่าความเข้มข้นของกรดที่ต่างกันไม่มีผลต่อค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้ ( $p > 0.05$ ) ส่วนอุณหภูมิและเวลา และปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับเวลา ในการแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสซิดิก มีผลต่อค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางผนวกที่ จ2) การที่ความเข้มข้นของกรด 0.5-1.5 โมลาร์ ไม่มีผลต่อค่าความหนา อาจเป็นเพราะสารละลายกรดแอสซิดิกสามารถทำลายพันธะ

เพียงบางชนิดภายในโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ซึ่งความเข้มข้นกรดที่ 0.5 โมลาร์ ก็เพียงพอในการทำลายพันธะเหล่านั้น แต่เมื่อเวลาและอุณหภูมิในการแช่ต่างกันพบว่า ที่ 28 องศาเซลเซียส เมื่อแช่เปลือกไข่นานขึ้น (26-72 ชั่วโมง) ความหนาของเยื่อจะเพิ่มขึ้น (ทุกความเข้มข้นกรด 0.5, 1.0, 1.5 โมลาร์) แต่ที่ 45-70 องศาเซลเซียส การแช่ในกรดที่ระยะเวลาต่างกันความหนาเยื่อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ยกเว้นในสารละลายกรด 1.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และการแช่เปลือกไข่ในกรดที่อุณหภูมิสูง (60-70 องศาเซลเซียส) ไม่ทำให้ความหนาของเยื่อเพิ่มขึ้น ( $p > 0.05$ ) (ตารางผนวกที่ 3) ทั้งนี้อธิบายได้ว่า เวลาและอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีเพิ่มขึ้น นั่นคือ มีการสลายพันธะภายในโครงสร้างของโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ได้มากขึ้น แต่อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ กับโปรตีน ซึ่งขัดขวางการพองตัวของเยื่อเปลือกไข่

จากตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าการแช่เปลือกไข่ในน้ำที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ได้เยื่อเปลือกไข่ที่มีความหนาอยู่ในช่วง 0.050-0.067 มิลลิเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับเยื่อเปลือกไข่สดจากการรายงานของสุวรรณ (2529) ที่รายงานความหนาของเยื่อเปลือกไข่ไก่สดว่ามีความหนาที่ด้านป้าน โดยด้านป้านมีความหนาของเยื่อประมาณ 0.069 มิลลิเมตร ด้านกลางหรือด้านข้างหนาประมาณ 0.065 มิลลิเมตร และด้านแหลมมีเยื่อหนาประมาณ 0.057 มิลลิเมตร ซึ่งความหนาของเยื่อเปลือกไข่ขึ้นอยู่กับพันธุ์และขนาดของไข่ไก่

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของกรดแอซีติกและอุณหภูมิในการแช่เปลือกไข่ต่อความหนาที่  
ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°ซ)	ความหนาของเยื่อเปลือกไข่ <sup>1</sup> (มิลลิเมตร)			
		0 โมลาร์	0.5 โมลาร์	1.0 โมลาร์	1.5 โมลาร์
24	28	0.067±0.001 <sup>aA</sup>	0.076±0.000 <sup>cA</sup>	0.071±0.001 <sup>bA</sup>	0.072±0.001 <sup>bA</sup>
	45	0.061±0.013 <sup>aA</sup>	0.082±0.004 <sup>bA</sup>	0.091±0.002 <sup>bB</sup>	0.089±0.002 <sup>bB</sup>
	60	0.063±0.004 <sup>aA</sup>	0.088±0.009 <sup>bA</sup>	0.095±0.006 <sup>bB</sup>	0.104±0.004 <sup>bC</sup>
	70	0.065±0.008 <sup>aA</sup>	0.081±0.004 <sup>bA</sup>	0.087±0.004 <sup>bB</sup>	0.087±0.006 <sup>bB</sup>
48	28	0.062±0.001 <sup>aA</sup>	0.082±0.000 <sup>bA</sup>	0.082±0.000 <sup>bA</sup>	0.087±0.001 <sup>cA</sup>
	45	0.060±0.004 <sup>aA</sup>	0.101±0.004 <sup>cB</sup>	0.086±0.009 <sup>bA</sup>	0.082±0.001 <sup>bA</sup>
	60	0.061±0.001 <sup>aA</sup>	0.092±0.006 <sup>bAB</sup>	0.088±0.006 <sup>bA</sup>	0.094±0.013 <sup>bA</sup>
	70	0.053±0.008 <sup>aA</sup>	0.091±0.001 <sup>bAB</sup>	0.089±0.008 <sup>bA</sup>	0.084±0.003 <sup>bA</sup>
72	28	0.050±0.002 <sup>aA</sup>	0.092±0.002 <sup>bA</sup>	0.097±0.001 <sup>cA</sup>	0.089±0.000 <sup>bA</sup>
	45	0.067±0.012 <sup>aA</sup>	0.088±0.023 <sup>bA</sup>	0.092±0.001 <sup>bA</sup>	0.095±0.001 <sup>bA</sup>
	60	0.065±0.012 <sup>aA</sup>	0.087±0.004 <sup>bA</sup>	0.089±0.003 <sup>bA</sup>	0.092±0.001 <sup>bA</sup>
	70	0.056±0.001 <sup>aA</sup>	0.085±0.011 <sup>bA</sup>	0.093±0.009 <sup>bA</sup>	0.095±0.006 <sup>bA</sup>

<sup>1</sup>ความหนาของเยื่อเปลือกไข่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอย่างจำนวน 3 ซีน วัด  
ชั้นละ 3 ตำแหน่ง

ตัวอักษร A, B, C ที่แตกต่างกันในแนวตั้งของระยะเวลาเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

( $p \leq 0.05$ )

เมื่อแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.5-1.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิและเวลา  
ต่างๆ (28-70 องศาเซลเซียส, 24-72 ชั่วโมง) ได้เยื่อเปลือกไข่ที่มีความหนา 0.071-0.104 มิลลิเมตร  
แสดงว่าเยื่อเปลือกไข่เกิดการพองตัวเนื่องจากการแช่ในกรดแอซีติก ซึ่งสุวรรณ (2529) อธิบายว่า  
การจุ่มเปลือกไข่ในสารละลายกรดแอซีติกจะทำให้คอลลาเจนในเยื่อเปลือกไข่พองตัว และ Friess  
(1998) อธิบายการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันว่า เกิดจากพันธะเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุลของ

คอลลาเจนแตกตัวโดยกรดแอสซิติค แล้วทำให้ประจุบน โทรโปคอลลาเจนผลักรัน จึงทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัวเกิดขึ้น

จากตารางที่ 6 พบว่าระยะเวลาในการแช่เปลือกไข่มีผลต่อค่าพีเอชของสารละลายที่แช่เปลือกไข่ เมื่อเวลาในการแช่เปลือกไข่นานขึ้น (24-72 ชั่วโมง) ที่ทุกความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสซิติค และอุณหภูมิในการแช่ พบว่าค่าพีเอชของสารละลายที่แช่เปลือกไข่เพิ่มขึ้น เมื่อใช้สารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 2.27 แช่เปลือกไข่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 4.57 ซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชของสารละลายหลังแช่เปลือกไข่ เกิดจากกรดคาร์บอนิก ( $H_2CO_3$ ) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดแอสซิติค ( $CH_3COOH$ ) กับแคลเซียมคาร์บอเนต ( $CaCO_3$ ) ในเปลือกไข่เปลี่ยนเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Nys *et al.*, 2004) สังเกตเห็นฟองแก๊สจากเปลือกไข่ลอยขึ้นสู่ผิวหน้าของสารละลาย การเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้ค่าพีเอชสารละลายมีค่าเพิ่มขึ้น (Kaewmanee *et al.*, 2011) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้พบในทุกสภาวะการทดลอง

ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของกรดแอสิติกและอุณหภูมิในการแช่เปลือกไข่ต่อค่าพีเอชของสารละลายหลังการแช่เยื่อเปลือกไข่ที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (°ซ)	ค่าพีเอช <sup>1</sup>			
		0 โมลาร์	0.5 โมลาร์	1.0 โมลาร์	1.5 โมลาร์
24	28	8.24	4.6	4.46	4.17
	45	7.38	5.11	4.6	4.49
	60	7.5	5.09	4.3	4.57
	70	7.8	5.4	4.76	4.68
48	28	8.5	4.9	4.55	4.25
	45	7.5	5.3	4.65	4.55
	60	7.8	5.15	4.4	4.65
	70	8.4	5.5	4.85	4.75
72	28	8.8	5.0	5.0	4.33
	45	7.84	5.5	4.72	4.62
	60	7.92	5.2	4.45	4.73
	70	8.7	5.7	4.9	4.82

#### <sup>1</sup>ค่าพีเอชของสารละลายกรดแอสิติกหลังการแช่เยื่อเปลือกไข่

จากผลการทดลองเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่ โดยใช้สารละลายกรดแอสิติกความเข้มข้นต่ำ 0.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเวลาในการแช่นาน 72 ชั่วโมง เนื่องจากการใช้สารละลายกรดแอสิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้ค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ที่ไม่แตกต่างทางสถิติจากเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสิติกที่สูงกว่านี้ (1 และ 1.5 โมลาร์) นอกจากนี้การใช้สารละลายกรดแอสิติกความเข้มข้นต่ำ (0.5 โมลาร์) ยังทำให้ไม่ต้องใช้น้ำปริมาณมากในการล้างกรดออกจากเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารละลายกรดแอสิติกความเข้มข้นสูง และการใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิห้องปกติ ทำให้ไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานในการควบคุมสภาวะ ส่วนการเลือกระยะเวลาการแช่ 72 ชั่วโมง เพราะจากผลการทดลองในการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ พบว่าที่เวลานี้ทำให้เยื่อเปลือกไข่หลุดแยกออกจากเปลือกไข่ได้ง่ายที่สุด (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ค่าพีเอช 5.00 ขณะแช่ยังช่วยรักษาโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Vlad, 2007) และการแช่เยื่อเปลือกไข่ในสารละลายกรด

แอสติกยังส่งผลในการช่วยทำลายแบคทีเรียและเชื้อโรคที่ติดมากับเปลือกไข่ได้ การที่เยื่อเปลือกไข่เกิดการพองตัวเมื่อแช่ในสารละลายกรดแอสติกมีผลดี คือ เมื่อนำเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้ไปผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสต สารละลายที่ไข่เป็นตัวไฮโดรไลซ์เยื่อเปลือกไข่ สามารถเข้าไปสัมผัสภายในโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ได้มากขึ้น

จากผลการทดลองข้างต้นสรุปว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ คือ การแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแยกเปลือกออกแล้ว จะนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วสะเด็ดน้ำเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

## 2. การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีและกายภาพของเยื่อเปลือกไข่

### 2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อเปลือกไข่

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อเปลือกไข่สดที่แยกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วลอกเยื่อ และเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้โดยแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ESMA) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่จากเปลือกไข่ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 1 ผลแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อเปลือกไข่สดที่แยกได้โดยการแช่น้ำ (ESMW) และเชื้อเปลือกไข่ที่แยกโดยสารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ESMA)

ตัวอย่าง	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเปียก)			
		(เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง)			
		โปรตีน (TN×6.25)	ไขมัน	เถ้า	คาร์โบไฮเดรต <sup>1</sup>
ESMW	49.53±1.37 <sup>b</sup>	46.70±2.01 <sup>a</sup> (92.52±3.99)	0.98±0.20 <sup>a</sup> (1.94±0.40)	1.38±0.01 <sup>a</sup> (2.73±0.02)	1.41 (2.81)
ESMA	56.50±1.03 <sup>a</sup>	41.90±0.22 <sup>b</sup> (96.32±0.50)	0.17±0.07 <sup>a</sup> (0.38±0.15)	1.21±0.21 <sup>b</sup> (2.35±0.12)	0.22 (0.95)

องค์ประกอบทางเคมีที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

<sup>1</sup> คำนวณจาก 100 – (เปอร์เซ็นต์ความชื้น + เปอร์เซ็นต์โปรตีน + เปอร์เซ็นต์ไขมัน + เปอร์เซ็นต์เถ้า)  
ตัวอักษร a, b ที่ต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  
( $p \leq 0.05$ )

เชื้อเปลือกไข่สดที่แยกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) มีองค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น 49.53 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อคำนวณต่อน้ำหนักแห้งจะมีโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและเถ้า เท่ากับ 92.52, 1.94, 2.81 และ 2.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีรายงานระบุว่าเถ้าในเชื้อเปลือกไข่ประกอบด้วยฟอสฟอรัส แคลเซียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ตะกั่ว โบรอน และอะลูมิเนียม (Wedral *et al.*, 1974; Tullet, 1987) จากรายงานของสุวรรณ (2529) พบว่าเชื้อเปลือกไข่ประกอบด้วยน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักเปียก) โปรตีน และสารอินทรีย์ 70 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) และ Paul *et al.* (2007) พบว่าเชื้อเปลือกไข่มีองค์ประกอบคือ น้ำ 13.9 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักเปียก) โปรตีน, ไขมัน, คาร์โบไฮเดรต และเถ้า เท่ากับ 70.77, 2.32, 0.52 และ 0.52 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างกันขององค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ พันธุ์ของไก่ อาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ อายุของไก่ รวมทั้งวิธีการในการแยกเชื้อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ เป็นต้น ซึ่งวิธีการในการแยกเชื้อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่นั้นมีผลต่อค่าความชื้นดังปรากฏในการทดลอง โดยพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อเปลือกไข่

ที่แยกได้โดยเลือกจากสภาวะที่ดีที่สุดในการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ (ESMA) มีความชื้น 56.50 เปอร์เซ็นต์ และองค์ประกอบอื่นๆ โดยน้ำหนักแห้ง คือ โปรตีน ไขมัน เถ้า และ คาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 96.32, 0.38, 2.35 และ 0.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเยื่อเปลือกไข่ที่แยกโดย แช่วเปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสติก (ESMA) มีความชื้นมากกว่าเยื่อเปลือกไข่สดที่แยกได้โดยการแช่ในน้ำ (ESMW) ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางที่ 7) ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับผลของค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ที่เพิ่มขึ้นเมื่อแช่ในกรด (ตารางที่ 5 และ 6) แสดงว่าเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้โดยการแช่ในสารละลายกรดแอสติก (ESMA) มีน้ำมากขึ้นโดยน้ำแทรกเข้าไปอยู่ในโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ เยื่อจึงมีการพองตัวทำให้วัดความหนาได้ค่ามากขึ้น นอกจากนี้ปริมาณเถ้ายังมีค่าลดลง ( $p \leq 0.05$ ) ในเยื่อที่แช่ในสารละลายกรดแอสติก (ตารางที่ 7) อาจเกิดจากการสูญเสียสารเหล่านี้ไประหว่างการแช่ในสารละลายกรดแอสติก โดยกรดทำให้เกิดการละลายของเถ้าหรือสารอนินทรีย์ (Kaewmanee *et al.*, 2009)

จากตารางแสดงองค์ประกอบทางเคมีของ ESMW และ ESMA แสดงให้เห็นว่าเยื่อเปลือกไข่มีองค์ประกอบหลักที่เป็นของแข็ง คือ โปรตีน และนอกจากนี้ยังมีไขมัน เถ้า และ คาร์โบไฮเดรตอีกเล็กน้อย โปรตีนที่พบในเยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่พบมาก คือ คอลลาเจน เคราติน และอีลาสติน (Yi *et al.*, 2003) โดย Torres *et al.* (2010) ระบุชนิดของโปรตีนที่พบในเยื่อเปลือกไข่ ได้แก่ โปรตีนเคราติน (keratin) หรือที่เรียกว่าโอโวเคราติน (ovokeratin) คอลลาเจน (collagen) รูปแบบต่าง ๆ คือ type I type V และ type X นอกจากนี้ Yi *et al.* (2004) Paul *et al.* (2007) และ Torres *et al.* (2010) รายงานว่ายังมีโปรตีนชนิดอื่นๆ ในเยื่อเปลือกไข่ เช่น ออสติโอพอนติน (osteopontin) เป็นต้น และมีสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ อีก ได้แก่ ไชอะโลโปรตีน (sialoprotein), กลูโคซามีน (glucosamine), ไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycans), คอนดรอยตินซัลเฟต (chondroitin sulfate), กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) และแซ็กคาไรด์อีกเล็กน้อย ซึ่งสัดส่วนของโปรตีนแต่ละชนิดยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแน่ชัด แต่จากการศึกษาของ Kodali *et al.* (2011) พบว่าโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วย cysteine-rich eggshell membrane protein ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีนที่ห่อหุ้มสเปิร์มของแบคทีเรีย จากปริมาณกรดแอมิโนไกลซินที่มีในโปรตีนจากเยื่อเปลือกไข่เท่ากับ  $9.5 \pm 2.8$  เปอร์เซ็นต์ เทียบเท่ากับปริมาณ คอลลาเจนซึ่งเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น และจากปริมาณซิสเตอีน (cysteine) เท่ากับ 7.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าโปรตีนเยื่อเปลือกไข่นี้ไม่ใช่อีลาสติน และพบ keratin-derived peptide เพียงชนิดเดียวในการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry จึงสรุปว่าเคราตินไม่ใช่องค์ประกอบหลักของเยื่อเปลือกไข่ ซึ่งเมื่อเยื่อเปลือกไข่ถูกย่อยสลายให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายได้ ก็จะได้โปรตีน เปปไทด์ กรดแอมิโน และสารต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เยื่อเปลือกไข่เป็น

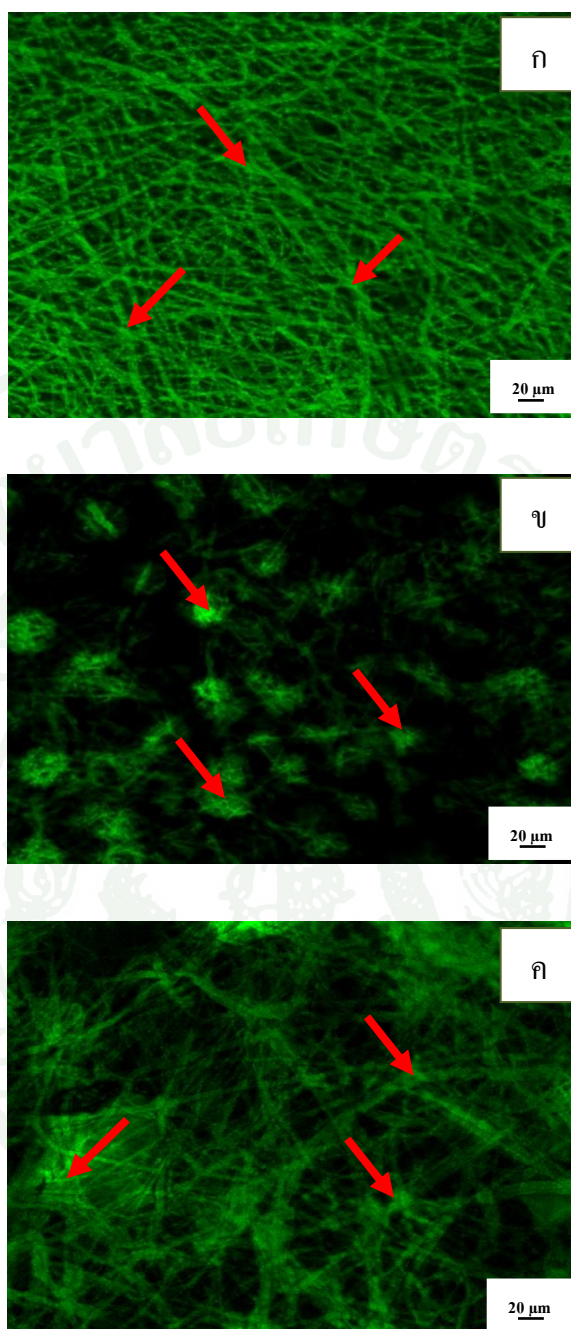
แหล่งเสริมสารเหล่านี้ในอาหาร เนื่องจากมีสารที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ซึ่งจะช่วยเสริมสร้างกล้ามเนื้อ และส่วนต่างๆ ของร่างกาย

## 2.2 การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของเยื่อเปลือกไข่

เยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากวิธีการแยกเยื่อ 2 สภาวะ คือ สภาวะที่ใช้สารละลายกรดแอสซิดิก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ESMA 0.5) และความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (ESMA 1.5) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง รวมทั้งเยื่อเปลือกไข่ที่แยกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) นำมาตรวจสอบโครงสร้างละเอียดของเยื่อเปลือกไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงเลเซอร์แบบส่องกราด (CLSM) โดยเลือกใช้สีย้อมฟลูออเรสซินไอโซไทโอไซยานาต (fluorescein-5-isothiocyanate, FITC) เพื่อย้อมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ ซึ่งสีย้อมสามารถติดหมู่แอมิโนของโปรตีน ทำให้เห็นโปรตีนเป็นสีเขียว ในการสำรวจโครงสร้างเยื่อด้านที่ติดกับเปลือกไข่จะให้ภาพโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอก (outer shell membrane) และการสำรวจโครงสร้างเยื่อด้านที่ติดกับไข่ขาวจะให้ภาพโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ชั้นใน (inner shell membrane) ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างเส้นใยของเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอก พบว่ามีโครงสร้างเส้นใยสานกันไปมาเป็นโครงร่างตาข่ายอย่างไม่เป็นระเบียบ สอดคล้องกับรายงานของสุวรรณ (2529) และ Liong *et al.* (1997) ที่รายงานว่าเยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วยเยื่อชั้นนอกและชั้นในซึ่งผนึกติดกัน เส้นใยในเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอกจะสานกันเป็นชั้นๆ สลับกันคล้ายกับรังนก โดยจะสานในแนวต่างๆ กัน คือ แนวขนานหรือแนวตั้งฉากกับเปลือกไข่ จึงทำให้เยื่อเปลือกไข่ชั้นนอกมีความเหนียว พื้นผิวของเส้นใยมีลักษณะขรุขระ

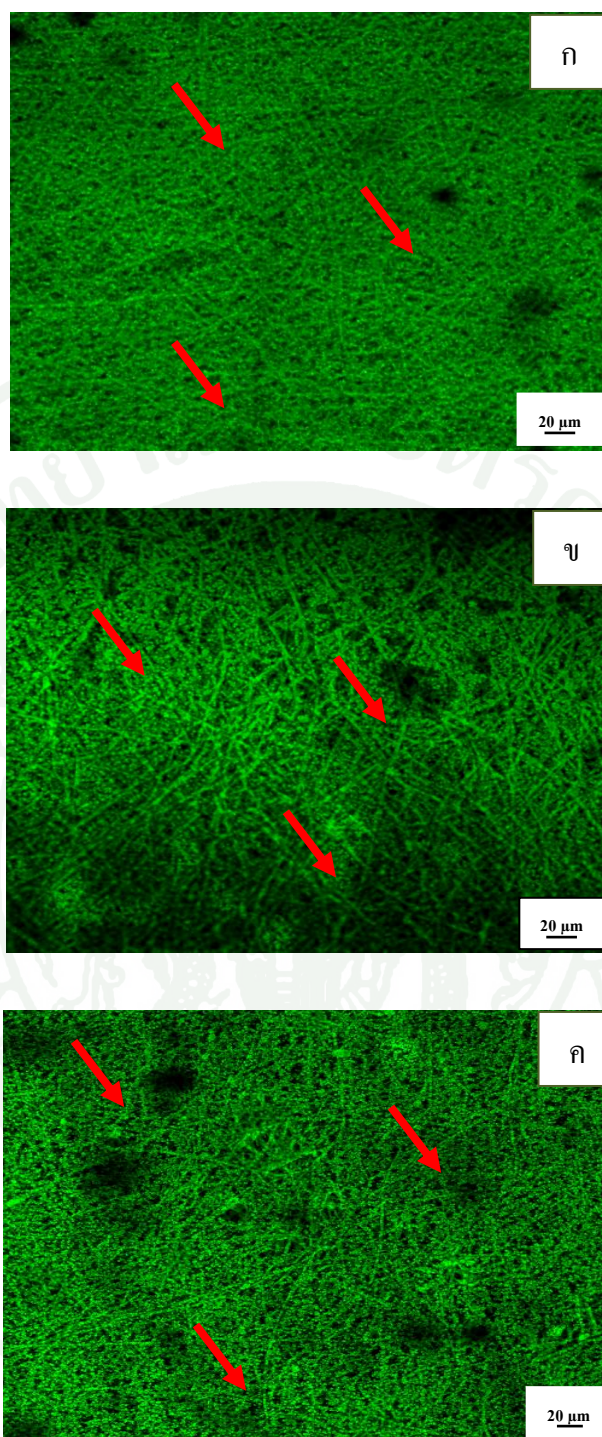
จากภาพที่ 10 (ก) ภาพเยื่อชั้นนอกของ ESMW พบว่าเส้นใยมีลักษณะเรียบ และเส้นใยสานกันไปมาอย่างไม่เป็นระเบียบ เป็นไปได้ว่าในการดึงลอกเยื่อ ส่วนหนึ่งของเยื่อชั้นนอกยังติดอยู่กับเปลือก พื้นผิวเยื่อที่มีลักษณะขรุขระจึงไม่ปรากฏในภาพ โดยเส้นใยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.05 ไมโครเมตร ส่วนภาพที่ 10 (ข) ภาพเยื่อชั้นนอกของ ESMA 0.5 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวของเยื่อมีลักษณะขรุขระ ไม่เรียบ เส้นใยมีขนาดเล็ก และเส้นใยไม่ต่อเนื่องเกาะกันเป็นกลุ่มๆ หลายกลุ่ม และมีช่องว่างระหว่างกลุ่มเส้นใยจึงสามารถเห็นเส้นใยในชั้นที่อยู่ถัดไป โดยเส้นใยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.67 ไมโครเมตร สำหรับภาพที่ 10 (ค) ภาพเยื่อชั้นนอกของ ESMA 1.5 พบว่ามีเส้นใยสานกันไปมาอย่างไม่เป็นระเบียบเช่นเดียวกัน และมีเส้นใยขนาดเล็กมาเกาะกลุ่มกัน พื้นผิวเยื่อมีลักษณะขรุขระเล็กน้อย เส้นใยเรียบ เส้นใยห่างกันและมีช่องว่างขนาดใหญ่ระหว่างเส้นใย และสามารถเห็นเส้นใยในชั้นถัดลงไป มีเส้นใยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.08 ไมโครเมตร ซึ่งจะเห็นว่าทั้ง 3 ภาพ มีเส้นใยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่อยู่ในช่วงเดียวกับการศึกษาของ Liong *et al.* (1997)

คือ 1-7 ไมโครเมตร (ตารางที่ 8) โดย ESMW มีเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า ESMA 0.5 และ ESMA 1.5 ( $p \leq 0.05$ ) เนื่องจาก ESMW ถูกแยกโดยการแช่ในน้ำ ส่วนต่าง ๆ ของเส้นใยจึงไม่ถูกย่อยหรือละลายไปกับน้ำ แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมีความแตกต่างกันระหว่าง ESMA 0.5 และ ESMA 1.5 โดย ESMA 0.5 มีเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า ESMA 1.5 แสดงว่าเส้นใยของ ESMA 0.5 ยังไม่ถูกย่อยสลายด้วยสารละลายกรดแอสซิดิก เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายต่ำ แต่พบว่า ESMA 1.5 เส้นใยถูกสารละลายกรดแอสซิดิกที่ความเข้มข้นสูงย่อยสารเคลือบผิวหลุดออกไป ทำให้เยื่อมีความแข็งแรงลดลงและเส้นใยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กลง ซึ่ง Tan *et al.* (1992) รายงานว่าเส้นใยในเยื่อเปลือกไข่จะมีชั้นของแมนเทิล (mantle) ซึ่งมีสารมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (mucopolysaccharide) และลิพอโปรตีน (lipoprotein) ห่อหุ้มล้อมรอบแกนของเส้นใยซึ่งเป็นโปรตีน จึงเป็นไปได้ว่าสารดังกล่าวที่ล้อมรอบเส้นใยอยู่อาจหลุดแยกจากเส้นใยระหว่างการแช่เยื่อในสารละลายกรดแอสซิดิก สิ่งที่พบในตัวอย่างทั้ง 3 ภาพ คือ บริเวณจุดเชื่อมของเส้นใย (junction zone) (ลูกศรชี้ในภาพ) สอดคล้องกับลักษณะที่รายงานโดย Liong *et al.* (1997) ซึ่งระบุว่าเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอกมีลักษณะที่เป็น junction zone และพบผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตในเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอก ซึ่งอาจเป็นตัวยึดเยื่อเปลือกไข่ให้ติดแน่นกับเปลือกไข่ และ Board and Fuller (1994) รายงานว่า เยื่อเปลือกไข่ชั้นนอกจะมีผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) ติดอยู่เช่นกัน จากภาพตัวอย่าง ESMA 0.5 และ ESMA 1.5 ซึ่งได้จากเยื่อเปลือกไข่ที่ไม่มีการขัดถูเยื่อ จึงอาจยังมีผลึก  $\text{CaCO}_3$  หลงเหลืออยู่หรือผลึกเหล่านั้นอาจจะมีการแทรกตัวอยู่ในเยื่อเปลือกไข่ ซึ่งมีผลทำให้ผิวเยื่อขรุขระ โดยจะพบผลึก  $\text{CaCO}_3$  น้อยลง เมื่อใช้สารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์



**ภาพที่ 10** โครงสร้างเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอก (outer shell membrane) ด้านผิวนอกที่ติดกับเปลือกไข่ (ก) เยื่อเปลือกไข่ที่แยกออกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) แล้วใช้มือดึงแยกเยื่อออกจากเปลือกไข่ (ข) เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ESMA 0.5) และ (ค) เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในกรดแอสซิติคความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (ESMA 1.5) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลูกศรชี้แสดงบริเวณจุดเชื่อมของเส้นใย (junction zone)

เยื่อเปลือกไข่ชั้นใน (inner shell membrane) อยู่ระหว่างเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอกกับไข่ขาว โดยจะล้อมรอบไข่ขาวส่วนนอก ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ชั้นในได้จากการถ่ายภาพเยื่อด้านที่ติดกับไข่ขาว จากภาพที่ 11 (ก) พบว่า ESMW มีลักษณะโครงสร้างเส้นใยขนาดเล็กสานกันไปมาเป็นโครงร่างตาข่ายอย่างไม่เป็นระเบียบ เป็นชั้นๆ และเส้นใยเชื่อมต่อกัน เยื่อมีความหนา และมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่าเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tan *et al.* (1992) โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยโดยเฉลี่ยได้ประมาณ 2.26 ไมโครเมตร (ตารางที่ 8) เยื่อชั้นในนี้เห็นเส้นใยไม่ชัดเจนเนื่องจากมีชั้นของโปรตีนรูปร่างกลมปิดคลุมเส้นใยซึ่งเมมเบรนที่ประกอบด้วยโปรตีนทรงกลมนี้มีชื่อเรียกว่า limiting membrane (ลูกศรชี้) (Liong *et al.*, 1997) จากรายงานของ Tan *et al.* (1992) และ Liong *et al.* (1997) กล่าวว่าเยื่อเปลือกไข่ชั้นในประกอบด้วยอนุภาคโปรตีนลักษณะกลมๆ เล็กๆ ขนาดไม่สม่ำเสมอเป็นคลื่นหรือเป็นลอนๆ และเกาะกันเป็นกลุ่มต่อเนื่องกันจนมีลักษณะเป็นแผ่น มีความหนาที่ไม่สม่ำเสมอ โปรตีนทรงกลมนี้ยังแทรกตัวอยู่ระหว่างเส้นใยชั้นในด้วย ซึ่งอนุภาคโปรตีนนี้มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.1-0.2 ไมโครเมตร โดยชั้น limiting membrane จะเชื่อมต่อกับเยื่อชั้นในจึงทำให้ไม่สามารถแยกออกจากเยื่อชั้นในได้ ซึ่งทำให้ไม่สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคโปรตีนทรงกลมในภาพนี้ได้ เนื่องจากอนุภาคซ้อนทับกัน และมีเส้นขอบของอนุภาคไม่ชัดเจน แต่จากการศึกษาของ Liong *et al.* (1997) ที่ศึกษาโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงเลเซอร์แบบส่องกราด (CLSM) สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยได้ อยู่ในช่วง 0.1-3.0 ไมโครเมตร และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคโปรตีนทรงกลมนี้ในช่วง 0.1-2.0 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ซึ่งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอยู่ในช่วง 0.3-2.0 ไมโครเมตร



ภาพที่ 11 โครงสร้างเยื่อเปลือกไข่ชั้นใน (inner shell membrane) บริเวณด้านในติดกับไข่ขาว โดย (ก) เยื่อเปลือกไข่ที่แยกออกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) (ข) เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในกรดแอสติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ESMA 0.5) และ (ค) เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในกรดแอสติกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (ESMA 1.5) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง ลูกศรชี้แสดงโปรตีนทรงกลมใน limiting membrane

เมื่อศึกษาโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในสารละลายกรดแอสซิติค (ESMA 0.5 และ ESMA 1.5) (ภาพที่ 11 (ข) และ (ค)) พบว่าโครงสร้างที่ได้มีลักษณะแตกต่างจากเยื่อเปลือกไข่ที่แยกออกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) คือ สามารถเห็นเส้นใยได้มากขึ้นและมีความชัดเจน ลักษณะของเส้นใยเป็นเส้นเล็กๆ สานกันไปมาอย่างไม่เป็นระเบียบ เนื่องจาก limiting membrane อาจหลุดหรือสลายตัวไป เนื่องจากสัมผัสกับกรดแอสซิติคเป็นเวลานาน แต่จากภาพก็ยังสามารถเห็นร่องรอยของ limiting membrane โดยจะเห็นเป็นอนุภาคทรงกลมแทรกอยู่ระหว่างเส้นใย ซึ่งเยื่อเปลือกไข่ที่แช่ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0.5 และ 1.5 โมลาร์ สามารถเห็น limiting membrane ได้ชัดเจนมากกว่าเยื่อเปลือกไข่ที่แยกออกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) ซึ่งจากภาพไม่สามารถวัดขนาดของแต่ละอนุภาคโปรตีนได้ เนื่องจากมีการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค แต่สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยได้โดยในเยื่อเปลือกไข่ที่แช่ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0.5 และ 1.5 โมลาร์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยขนาด 2.60 และ 2.40 ไมโครเมตร (ตารางที่ 8) ตามลำดับ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยไม่แตกต่างจาก ESMW ( $p > 0.05$ ) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วงเดียวกับการศึกษาของ Liong *et al.* (1997) (ตารางที่ 8)

เห็นได้ว่าโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ESMA 0.5) ยังคงมีลักษณะของโครงสร้างที่มีความใกล้เคียงกับเยื่อเปลือกไข่ที่แยกออกโดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ (ESMW) และโครงสร้างถูกย่อยสลายด้วยสารละลายกรดแอสซิติคน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (ESMA 1.5) นอกจากนี้ขนาดเส้นใยของเยื่อเปลือกไข่ชั้นในยังมีความหนามากขึ้น จึงสนับสนุนข้อสรุปในการเลือกสภาวะที่ใช้สารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อเปลือกไข่ไม่มากนักดังที่พบโครงสร้างเยื่อ ESMA 0.5 ไม่ต่างไปจากเยื่อที่แช่น้ำ ESMW

ตารางที่ 8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากการแยกเปลือกไข่ด้วยสภาวะต่างๆ

ชั้นเมมเบรน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง <sup>1</sup> (ไมโครเมตร)			Liong <i>et al.</i> (1997)
	เยื่อเปลือกไข่	เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่าน	เยื่อเปลือกไข่ที่ผ่าน	
	สดที่แยกออก	การแช่กรดแอสซิดิก	การแช่กรดแอสซิดิก	
	โดยแช่เปลือกไข่ในน้ำ	ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	
	(ESMW)	(ESMA0.5)	(ESMA1.5)	
โปรตีนทรงกลม	NA	NA	NA	<0.1 - 2.0
เยื่อเปลือกไข่ชั้นใน	2.26±0.3601 <sup>a</sup>	2.60±0.2833 <sup>a</sup>	2.40±0.1783 <sup>a</sup>	<0.1 - 3.0
เยื่อเปลือกไข่ชั้นนอก	4.05±0.1630 <sup>a</sup>	3.67±0.3752 <sup>b</sup>	3.08±0.2025 <sup>c</sup>	1 - 7

<sup>1</sup>ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแสดงด้วยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (เส้นใย 50 เส้น)

NA หมายถึง ไม่สามารถวัดขนาดอนุภาคได้

ตัวอักษร a, b, c ที่ต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

( $p \leq 0.05$ ) โดยไม่รวมค่าจาก Liong *et al.* (1997)

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่น้ำและสารละลายกรดแอสซิดิกสรุปได้ว่า การแช่เยื่อเปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้เยื่อเปลือกไข่เกิดการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก โดยโปรตีนที่เป็นเส้นใยยังคงอยู่ในโครงสร้าง และการที่เยื่อเปลือกไข่เกิดการพองตัวเมื่อแช่ในสารละลายกรดแอสซิดิก เกิดจากพันธะเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุลของโปรตีนแตกตัวโดยกรดแอสซิดิก แล้วทำให้ประจุบนโปรตีนผลักรัน จึงทำให้โครงสร้างของเส้นใยมีการพองตัวเกิดขึ้น (Friess, 1998) ซึ่งมีผลดีคือ เมื่อนำเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้ไปผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสต สารละลายที่ใช้เป็นตัวไฮโดรไลซ์เยื่อเปลือกไข่ สามารถเข้าไปสัมผัสภายในโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ได้มากขึ้น ดังนั้นที่สภาวะนี้จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวอุกคิบเริ่มต้นของการไฮโดรไลซ์เพื่อผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสต

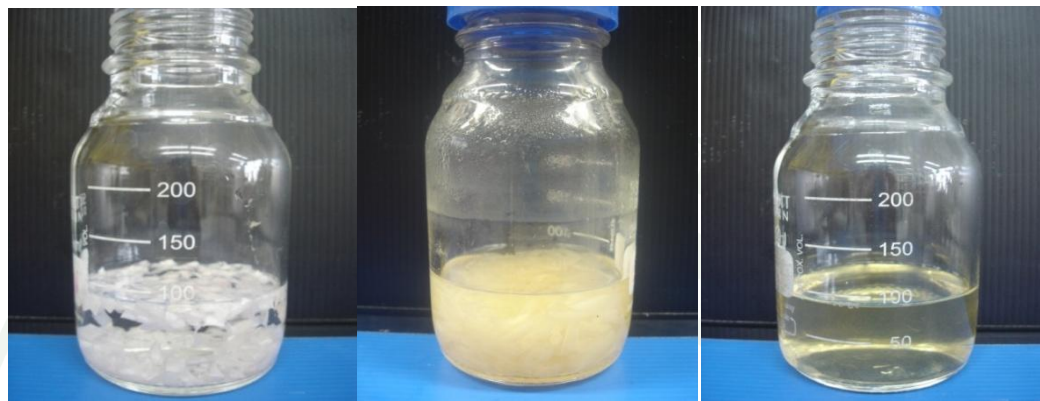
### 3. การศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเยื่อเปลือกไข่

#### 3.1 ผลของชนิดสารรีดิวซิ่งและอุณหภูมิในการไฮโดรไลซ์

เมื่อนำเยื่อเปลือกไข่ที่แยกจากเปลือกไข่โดยการแช่เปลือกไข่ในสารละลายกรดแอสซิดิก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาตัดให้เป็นชิ้นขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร และยาว 0.5 เซนติเมตร โดยใช้เยื่อเปลือกไข่ 1.5 กรัม ทำการย่อยสลายโดยใช้สารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ร่วมกับการเติมสารรีดิวซิ่งต่างกัน คือ แอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์ โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (C) หรือ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (M) หรือการไม่เติมสารรีดิวซิ่ง (NR) จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส หรือ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้ความร้อนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ทุกตัวอย่าง ยังคงปรากฏชิ้นของเยื่อเปลือกไข่ที่ยังมีลักษณะเป็นแผ่น โดยส่วนมากมีสีขาวขุ่น แต่มีบางส่วนที่เริ่มมีลักษณะโปร่งแสงขึ้น แสดงให้เห็นว่าเยื่อเปลือกไข่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นบ้าง คือ อาจมีการย่อยเยื่อเปลือกไข่ได้เล็กน้อย ดังภาพที่ 12 (ข) เมื่อนำสารละลายและเยื่อเปลือกไข่ มาปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และสุ่มของเหลวไปศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ภาพที่ 13) พบว่า เยื่อเปลือกไข่ยังคงมีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นใยสานกัน ไปมา แต่ไม่ซ้อนทับกันหลายชั้นเหมือนกับที่ปรากฏในเยื่อเปลือกไข่สด ดังภาพที่ 14 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ร่วมกับการใช้สารรีดิวซิ่ง หรือไม่ใช้สารรีดิวซิ่ง ยังไม่สามารถทำให้เยื่อเปลือกไข่เกิดการย่อยสลายจนเป็นสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตได้ แต่มีการย่อยเยื่อเกิดขึ้นได้เล็กน้อย

สำหรับตัวอย่างที่มีการนำไปให้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูง อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าในทุกตัวอย่างที่สภาวะนี้ให้ผลเหมือนกัน คือ เยื่อเปลือกไข่ที่มีลักษณะเป็นชิ้นสีเหลืองจืดระเหยง่าย และมีความขุ่นทึบแสง (ภาพที่ 12 (ก)) ซึ่งอยู่ในสารละลายเริ่มต้นก่อนการย่อยได้หายไป เมื่อดูด้วยตาเปล่า เห็นเพียงสารละลายใสสีเหลือง (ภาพที่ 12 (ค)) แสดงว่าเยื่อเปลือกไข่เกิดการย่อยสลายได้ดี เมื่อนำสารละลายไฮโดรไลเสตที่ได้ (ก่อนกรอง) จากการย่อยสลายโดยมีการเติมแอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์ โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน (C) 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (M) และไม่เติมสารรีดิวซิ่ง (NR) ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) ที่กำลังขยาย 10 เท่าของเลนส์วัตถุ ภาพที่ 15 (ก1 ข1 และ ค1) จะเห็น

ภาพลักษณะโครงสร้างของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเชื้อเปลือกไข่ในบริเวณกว้าง พบว่าลักษณะโครงสร้างของทั้ง 3 ตัวอย่าง มีลักษณะเป็นอนุภาคใสที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม กระจายอยู่ทั่วไปในภาพ มีทั้งที่อยู่เป็นอนุภาคเดี่ยวๆ และเกาะกลุ่มกัน แต่ภาพที่ได้ไม่ชัดเจนนัก จึงได้เพิ่มกำลังขยายของเลนส์วัตถุเป็น 40 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างที่ละเอียดขึ้นของตำแหน่งต่างๆ

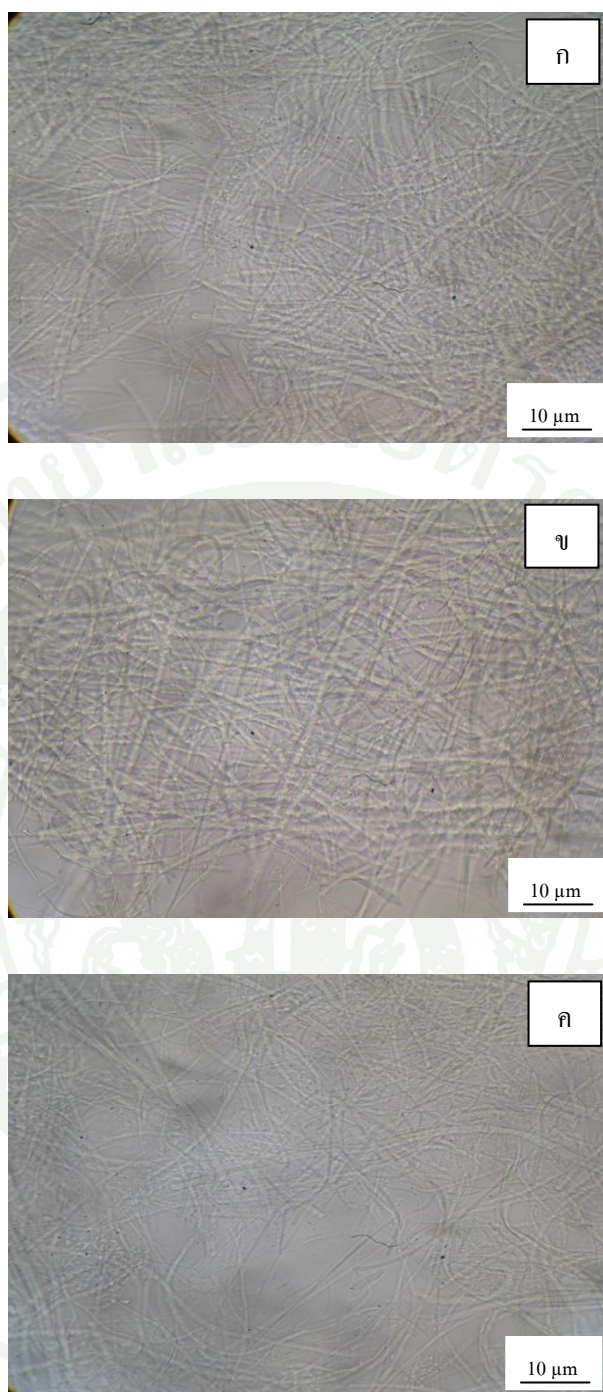


(ก)

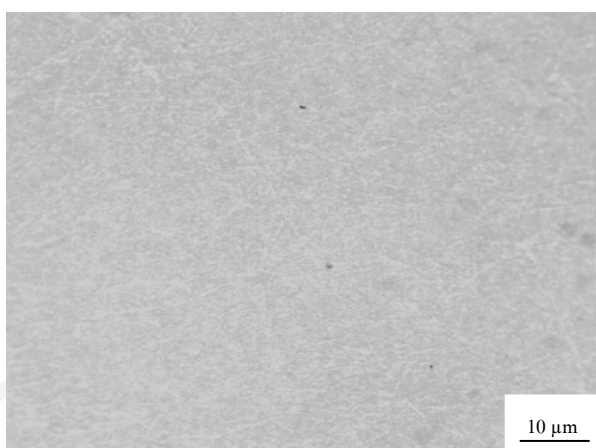
(ข)

(ค)

**ภาพที่ 12** ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเชื้อเปลือกไข่ที่สภาวะต่างๆ (ก) เชื้อเปลือกไข่ในสารละลายบรรจุในขวดแก้วก่อนนำไปให้ความร้อน (ข) เชื้อเปลือกไข่ในสารละลายหลังนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ค) สารละลายของเชื้อเปลือกไข่ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในหม้อน้ำความดันสูง (20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 โครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ก) เดิมแอล-ซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัม โปรตีน (ข) เดิม 2 – เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (ค) ไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้เลนส์วัตถุ×10

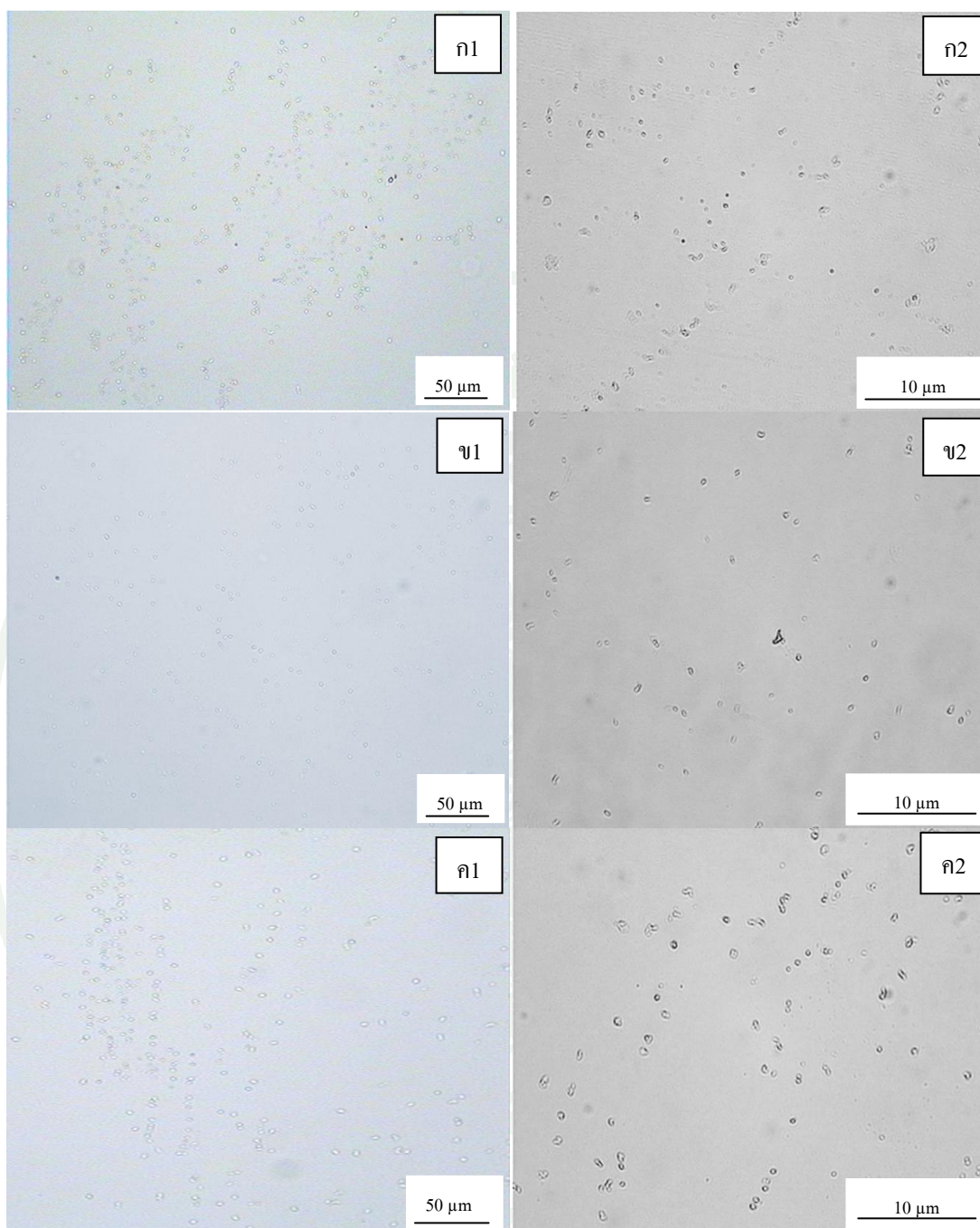


ภาพที่ 14 โครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่สดที่ผ่านการลอกออกจากเปลือกไข่ สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้เลนส์วัตถุ  $\times 10$

จากภาพที่ 15 (ก2 ข2 และ ค2) ซึ่งใช้กำลังขยาย 40 เท่า จะเห็นลักษณะโครงสร้างของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ชัดเจนมากขึ้น พบว่า ลักษณะโครงสร้างของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเยื่อเปลือกไข่ที่ได้ มีอนุภาคโปร่งแสง รูปร่างค่อนข้างกลม กระจายอยู่ทั่วไปภาพ มีทั้งที่อยู่เป็นอนุภาคเดี่ยวๆ และเกาะกลุ่มกันในทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ข่อยโดยการเติมแอล-ซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน (C) (ก2) และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (M) (ข2) มีจำนวนอนุภาคน้อยและมีขนาดเล็กกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ข่อยโดยไม่มีการเติมสารรีดิวซิง (NR) (ค2) โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 0.74, 0.69 และ 0.80  $\mu\text{m}$  ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ดังตารางที่ 9 โดยอนุภาคเหล่านี้น่าจะเป็นส่วนของเยื่อเปลือกไข่ที่เหลืออยู่ภายหลังการไฮโดรไลซ์ โดยจะเห็นว่า แอล-ซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (M) ข่อยสลายเยื่อเปลือกไข่ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังนั้น การใช้อุณหภูมิสูงถึง 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในสภาวะกรด เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง ทำให้เยื่อเปลือกไข่เกิดการข่อยสลาย ได้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งประกอบด้วยอนุภาคของแข็งที่แขวนลอยในสารละลาย

จากลักษณะโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จะเห็นว่า การใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เยื่อเปลือกไข่เกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เยื่อเปลือกไข่มีการข่อยสลายได้ดีมาก ซึ่งการข่อยสลายของเยื่อเปลือกไข่ทั้ง 2 สภาวะนี้ สามารถอธิบายได้ดังนี้ โดย Yi *et al.* (2004) และ Kodali *et al.*

(2011) รายงานว่าโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์จำนวนมาก เมื่อเยื่อเปลือกไข่สัมผัสกับสารรีดิวซิง คือ แอล-ซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) หรือ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (M) ซึ่งมีหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (-SH) อยู่ในโครงสร้างเช่นเดียวกัน จึงไปจับกับกรดแอมิโนซิสเทอีนในเยื่อเปลือกไข่ เป็นผลทำให้เกิดการสลายตัวของพันธะไดซัลไฟด์ (Yi *et al.*, 2004) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในการย่อยเยื่อเปลือกไข่ได้มีการรายงานไว้โดย Yi *et al.* (2003) ในการเตรียมโปรตีนเยื่อเปลือกไข่ที่ละลายได้ (soluble eggshell membrane protein, SEP) จากเยื่อเปลือกไข่ โดยการสลายเยื่อเปลือกไข่ ในสารละลายกรด 3-เมอร์แคปโตโพรพอิก (3-mercaptopropionic acid) ที่อยู่ในสารละลายกรดแอซีติก แล้วนำไปปรับพีเอชให้เท่ากับ 5 สังเกตการเปลี่ยนแปลงของลักษณะพื้นผิวและความหนาของเยื่อเปลือกไข่ด้วย SEM พบว่าในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลาย ความหนาของเยื่อเปลือกไข่ จะค่อยๆ ลดลง แต่ไม่มีการพองตัวที่ชัดเจนของเส้นใยในเยื่อเปลือกไข่ อธิบายได้ว่าในเยื่อเปลือกไข่มีเส้นใยที่เชื่อมโยงกันภายในสูง ซึ่งการสลายตัวจะเริ่มจากพื้นผิว (หนึ่งหรือทั้งสองด้าน) ของเมมเบรนด้านที่สัมผัสกับกรด 3-เมอร์แคปโตโพรพอิกจะเกิดการสลายพันธะไดซัลไฟด์ในโครงสร้าง เส้นใยขนาดเล็กจำนวนมากที่สานกันเป็นร่างแหค่อยๆ ถูกทำลายและย่อยสลายเป็นชั้นๆ แสดงให้เห็นว่าถ้าเกิดการสลายตัวของพันธะไดซัลไฟด์ก็จะทำให้เกิดการสลายตัวของเส้นใยของเยื่อเปลือกไข่ โดยเยื่อเปลือกไข่จะนุ่มและมีขนาดเล็กลง แขนวลอย (suspension) อยู่ในสารละลาย



ภาพที่ 15 โพรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ (ก่อนกรอง) ที่ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดย (ก) เดิมแอล-ซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัมโพรตีน (C) (ข) เดิม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัมโพรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (M) และ (ค) ไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) (ภาพ ก1-ค1, สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้เลนส์วัตถุ  $\times 10$  ส่วนภาพ ก2-ค2, สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้เลนส์วัตถุ  $\times 40$ )

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส โครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่ถูกทำลายได้เป็นสารละลายใส (ภาพที่ 12 (ค)) ทั้งสามตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่มีการเติมแอล-ซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (M) และไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าในการทดลองมีการใช้อุณหภูมิสูงถึง 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับการใช้สารละลายที่เป็นกรด จึงสามารถสลายพันธะไดซัลไฟด์ของเคราตินได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Karthikeyan *et al.* (2007) ที่รายงานเรื่องการใช้ความดันสูง (10-15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) และ/หรืออุณหภูมิสูง (80-140 องศาเซลเซียส) ร่วมกับสารละลายกรดหรือเบส เวลาการบ่มมากกว่า 2-3 ชั่วโมง ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของเคราติน ทำให้ได้ไฮโดรไลสที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ที่ละลายในน้ำ โอลิโกเปปไทด์ และกรดแอมิโนอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ Shoji *et al.* (2004) ว่าการย่อยสลายเยื่อเปลือกไข่ยังได้แซคคาไรด์เป็นส่วนประกอบอีกด้วย

**ตารางที่ 9** ขนาดอนุภาคของโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ที่เติมสารรีดิวซิงต่างกันแล้ว ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง สํารวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้เลนส์วัตถุ  $\times 40$

ชนิดของสารรีดิวซิง	ขนาดอนุภาค <sup>1</sup> ( $\mu\text{m}$ )
แอล-ซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัม โปรตีน	0.74 $\pm$ 0.19a
2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัม โปรตีน	0.69 $\pm$ 0.18a
ไม่เติมสารรีดิวซิง	0.80 $\pm$ 0.21b

<sup>1</sup>ขนาดอนุภาคของโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่แสดงด้วยค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 100 อนุภาค) ตัวอักษร a, b ที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ที่ได้จากสภาวะการย่อยต่างๆ ไปวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ โดยนำของผสมหลังการย่อยไปหมุนเหวี่ยง แยกส่วนในสมากรอง นำส่วนที่กรองได้ไปอบแห้งเพื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็ง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ และเปอร์เซ็นต์ผลได้ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเชื้อเปลือกไข่ที่สภาวะการย่อยต่างๆ กัน

ชนิดของสารรีดิวซิง	ไฮโดรไลสได้จากสภาวะการย่อย ความดันบรรยากาศ ที่ 90°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง		ไฮโดรไลสได้จากสภาวะการย่อย ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ 120°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง	
	ของแข็งที่ละลาย ได้ (เปอร์เซ็นต์)	ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)	ของแข็งที่ละลายได้ (เปอร์เซ็นต์)	ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)
	แอล-ซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัม โปรตีน	0.25 ± 0.03 <sup>b</sup>	17.41	1.16 ± 0.05 <sup>a</sup>
2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัม โปรตีน	0.40 ± 0.01 <sup>a</sup>	23.07	1.08 ± 0.06 <sup>a</sup>	88.45
ไม่เติมสารรีดิวซิง	0.26 ± 0.01 <sup>b</sup>	12.31	0.96 ± 0.10 <sup>b</sup>	80.25

ตัวอักษร a, b ที่ต่างกัน ในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากตารางที่ 10 พบว่าการเติมสารรีดิวซิงแอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัม โปรตีน (C) หรือ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัม โปรตีนในเชื้อเปลือกไข่ (M) และไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ได้โปรตีนไฮโดรไลสที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 0.25, 0.40 และ 0.26 และเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการย่อยสลายเชื้อเท่ากับ 17.41, 23.07 และ 12.31 ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งค่าดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเชื้อเปลือกไข่เกิดการย่อยสลายเพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิและความดันบรรยากาศปกติ และการเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัม โปรตีนในเชื้อเปลือกไข่ (M) ช่วยให้เกิดการย่อยสลายเชื้อได้ดีที่สุด สำหรับการย่อยสลายเชื้อเปลือกไข่ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง (20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสมีค่าเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยพบว่าตัวอย่างที่ไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) มีค่าต่ำที่สุด และตัวอย่างที่มีการเติมแอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) และเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (M) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการ

ใช้สารรีดิวซิ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่า และแอล-ซีส테인 ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) ยังมีเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการย่อยสลายเชื้อสูงด้วย

จากผลของการย่อยสลายเชื้อเปลือกไข่ พบว่าสภาวะที่ทำให้เกิดการละลายเชื้อเปลือกไข่ได้ คือ การใช้อุณหภูมิสูง 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในสารละลายกรดแอสติก (ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง ไฮโดรไลสที่ได้เป็นสารละลายใส มีอนุภาครูปร่างค่อนข้างกลม กระจายอยู่ทั่วไป เมื่อนำส่วนใสของโปรตีนไฮโดรไลส จากตัวอย่างที่มีการเติมแอล-ซีส테인 ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) หรือ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (M) หรือไม่เติมสารรีดิวซิ่ง (NR) มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลาวรีดังตารางที่ 11 พบว่าตัวอย่างที่มีการเติมแอล-ซีส테인 ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) มีปริมาณโปรตีน 13.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไฮโดรไลส ซึ่งมีค่าสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ ( $p \leq 0.05$ ) เนื่องจากการหาค่าโปรตีนโดยวิธีนี้ยังมีข้อจำกัด คือ sulphhydryl reagent และสารประกอบของไทออล (thiol compound) จะทำให้ค่าที่ได้เกิดความคลาดเคลื่อน (Lowry *et al.*, 1951; Price, 1996) ดังนั้น ค่าที่ได้ในตัวอย่างที่มีการเติมแอล-ซีส테인 ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) จึงน่าจะมีค่าสูงกว่าค่าจริง

**ตารางที่ 11** ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลสจากเชื้อเปลือกไข่ที่เติมสารรีดิวซิ่งต่างกัน และเปอร์เซ็นต์ของแข็ง แล้วทำการย่อยที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

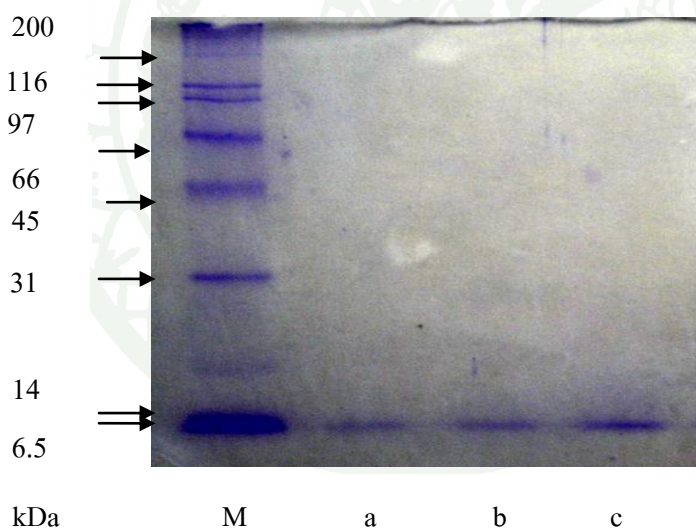
ชนิดของสารรีดิวซิ่ง	ปริมาณโปรตีน <sup>1</sup> (มิลลิกรัม/มิลลิลิตรไฮโดรไลส)
แอล-ซีส테인 ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน	13.13 ± 0.57 <sup>a</sup>
2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัมโปรตีน	10.76 ± 0.21 <sup>b</sup>
ไม่เติมสารรีดิวซิ่ง	11.66 ± 0.02 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>ปริมาณโปรตีนวิเคราะห์โดยวิธีลาวรี

ตัวอักษร a, b ที่ต่างกัน ในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสจากเชื้อเปลือกไข่ ที่ผ่านการย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ด้วยสารละลายกรดแอสติกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเติมแอล-ซีส테인 ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน (C)

หรือเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (M) และไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) มาผ่านการเหวี่ยงแยกและกรองแยกเอาเฉพาะส่วนใส มาศึกษาขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 12 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 6.5-200 กิโลดาลตัน แสดงผลดังภาพที่ 16 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสได้จากเยื่อเปลือกไข่ที่ได้ ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล 6.5 กิโลดาลตัน เหมือนกันทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยในสารละลายไฮโดรไลสที่ได้ นอกจากเปปไทด์แล้ว ยังมีสารอื่นๆ ที่น่าจะเป็นส่วนประกอบในไฮโดรไลสได้จากเยื่อเปลือกไข่อีก ได้แก่ กรดไฮยาลูโรนิก กลูโคซามีน คอนดรอยติน (Vlad, 2007) (US 2007/0178170 A1) เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเยื่อเปลือกไข่แต่การใช้สภาวะการย่อยที่อุณหภูมิและความดันสูงอาจทำให้สารเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปอื่น Più *et al.* (2012) ระบุว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 กิโลดาลตัน ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนที่เป็นวัตถุดิบ ซึ่งเปปไทด์จากการย่อยเยื่อเปลือกไข่ในงานวิจัยนี้น่าจะมีคุณสมบัติดังกล่าวและควรมีการศึกษาต่อไป



**ภาพที่ 16** เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 12 เปอร์เซ็นต์ แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนในไฮโดรไลสได้จากเยื่อเปลือกไข่ (หลังกรอง) ที่ผ่านการย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายกรดแอสซิดิกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมแอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) (lane a) หรือ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (M) (lane b) หรือไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) (lane c) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (lane M)

ดังนั้น สภาวะที่ทำให้เกิดการละลายได้ของเยื่อเปลือกไข่เพื่อให้ได้เป็น โปรตีนไฮโดรไลเสตจากเยื่อเปลือกไข่ คือ การใช้อุณหภูมิสูง 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในสารละลายกรดแอสติคความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการย่อยสลายเป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง โดยมี การเติมสารรีดิวิง คือ แอล-ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต (C) เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์ ผลได้ของการย่อยสูงถึง 94.64 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับน้ำหนักส่วนที่เป็นของแข็งในเยื่อ) โดยถ้า ต้องการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเยื่อเปลือกไข่เพื่อให้ได้ไฮโดรไลเสตผงประมาณ 1 กรัม จะต้องใช้เยื่อเปลือกไข่จำนวน 2.43 กรัม ซึ่งมาจากเปลือกไข่สดจำนวน 60.75 กรัม หรือมาจากไข่ จำนวนประมาณ 9 ฟอง (วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ก)



## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

#### 1. สถานะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่

สถานะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ คือ การแช่เปลือกไข่ (ที่ทาบพอให้แตกโดยเยื่อไม่ขาด) ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 28 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง โดยเยื่อเปลือกไข่มีการพองตัว และเปลือกไข่หลุดแยกจากเยื่อเปลือกไข่ได้ง่าย

#### 2. การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีและกายภาพของเยื่อเปลือกไข่

##### 2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อเปลือกไข่

เยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้จากสถานะการแช่ในสารละลายกรดแอสซิติค (ESMA) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 28 องศาเซลเซียส แช่นาน 72 ชั่วโมง เกิดการพองตัวอูมน้ำ โดยพบว่ามีค่าความชื้น 56.50 เปอร์เซ็นต์ และมีโปรตีน ไขมัน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต 96.32, 0.38, 2.35 และ 0.95 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากเยื่อเปลือกไข่ที่ดึงแยกจากเปลือกไข่ที่แช่ในน้ำ (ESMW) ซึ่งมีความชื้นต่ำกว่า (49.53 เปอร์เซ็นต์)

##### 2.2 ลักษณะโครงสร้างละเอียดของเยื่อเปลือกไข่

เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงเลเซอร์แบบส่องกราด ใช้ฟลูออเรสซินไอโซไทโอไซยานาต (FITC) เพื่อย้อมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ พบว่าประกอบด้วยเยื่อชั้นนอก และเยื่อชั้นใน โดยเยื่อชั้นนอกพื้นผิวของเยื่อมีลักษณะขรุขระ ไม่เรียบ มีเส้นใยสานกันไปมาอย่างไม่เป็นระเบียบ สังเกตเห็น junction zone เป็นจุดเชื่อมต่อของเส้นใย ส่วนเยื่อชั้นในมีเมมเบรนที่ประกอบด้วยโปรตีนทรงกลม เรียกว่า limiting membrane ปิดคลุมเส้นใยที่สานกันอย่างไม่เป็นระเบียบ โดยเยื่อที่ผ่านการแช่ในสารละลายกรดแอสซิติคจะเห็นเส้นใยได้ชัดกว่าเยื่อที่ไม่ได้สัมผัสกับสารละลายกรดแอสซิติค

### 3. การศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้สารละลายกรด แอซีติกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อสารละลายกรดแอซีติก เท่ากับ 1.5:80 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมีการเติมแอล-ซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน (C) หรือเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 9.22 ไมโครลิตรต่อกรัมโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ (M) และไม่เติมสารรีดิวซิง (NR) ร่วมกับการใช้ความร้อนอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทำการย่อยสลายเป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยโปรตีนไฮโดรไลสจากเยื่อเปลือกไข่ที่ได้ภายใต้สภาวะดังกล่าว เมื่อนำส่วนใสของไฮโดรไลสไปวิเคราะห์ พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 1.16, 1.08 และ 0.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบส่วนประกอบ คือ เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล 6.5 กิโลดาลตัน การใช้สารรีดิวซิงทำให้เยื่อเปลือกไข่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่าการไม่เติมสารรีดิวซิง และการเติมสารรีดิวซิงมีส่วนช่วยในการย่อยเยื่อเปลือกไข่ภายใต้สภาวะความดันสูง

### ข้อเสนอแนะ

1. อาจมีการศึกษาการแยกเชื้อเปลือกไข่ และการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยใช้เปลือกไข่เป็ดแทนเปลือกไข่ไก่
2. โปรตีนไฮโดรไลเสตมีคุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่หลายประการ ดังนั้น ควรมีการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเปลือกไข่ เช่น คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน เป็นต้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพัฒนาผลิตภัณฑ์
3. ขนาดโมเลกุลที่พบ 6.5 กิโลดาลตัน เป็นขนาดที่มีการระบุว่าเป็นเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) ซึ่งมีสมบัติที่น่าสนใจ ได้แก่ สมบัติเชิงหน้าที่หลายหน้าที่ ซึ่งเกี่ยวข้องกับหน้าที่ในร่างกาย เช่น การควบคุมความดันเลือด ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ ช่วยบำรุงกระดูก ปรับปรุงเมตาบอลิซึมของไขมัน เป็นแอนติออกซิเดนท์ในเซลล์และเนื้อเยื่อ และปรับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไป
4. ควรนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเปลือกไข่ที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดแอมิโน และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น กลูโคซามีน คอนดรอยติน กรดไฮยาลูโรนิก เป็นต้น

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เดลินิวส์. 2553. **เปลี่ยนเปลือกหอยเปลือกไข่**. แหล่งที่มา:

<http://www.thainewslnd.com/a431771>, 13 มกราคม 2554.

ฉัตรเจต โตรอด. 2552. **การแยกเยื่อจากเปลือกไข่ด้วยเทคนิคการแต่งแร่**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เนตรนภิส ธีระวัลย์ชัย. 2554. **สารชีวโมเลกุล**. แหล่งที่มา:

<http://www.si.mahidol.ac.th/departement/biochemistry/home/announcement/>, 3 สิงหาคม 2554.

บัญชา พนเจริญสวัสดิ์, วิไลวรรณ ภูถออ, รัตนา เฟื่องชูนุต, กอบศิริ วรศรี, รันนิจิร ชิงห์ และ กนกพจน์ อารีกุล. 2537. **คู่มือปฏิบัติการฟิสิกส์ I**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประสิทธิ์ แผ้วบาง และ อรไท สุขเจริญ. 2542. **การเปรียบเทียบการดูดซับตะกั่ว (2+) โดยใช้เปลือกไข่และเกลือปลา**. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 7(2): 51-57.

ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. ม.ป.ป. **ไมโครมิเตอร์**. ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. แหล่งที่มา:  
<http://203.158.100.100/physics/oldfront/71/3/measurement1.htm#micro>, 29 มิถุนายน 2554.

มนฤทัย ศรีทองเกิด. 2551. **การใช้เมมเบรนเทคโนโลยีเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือกระบวนการผลิตเนื้อไก่**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุรัตน์ ปรมีสนาภรณ์. 2544. **การพัฒนาวัสดุดูดซับจากเปลือกไข่เพื่อกำจัดแคดเมียม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

- รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์. 2545. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตไขมันต่ำจากของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษร. 2539. หน่วยที่ 9 ไข่. หน้า 45-122. ใน อาหารและโภชนาการ. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.
- วลัยพร โพนคำ กุลยา ลีรุ่งเรืองรัตน์ และอาภัสรา แสงนาค. 2546. การสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กรดอินทรีย์. วิทยานิพนธ์, มหาวิทยาลัยบูรพา.  
แหล่งที่มา: [http://www.irpus.or.th/project\\_file/B18.pdf](http://www.irpus.or.th/project_file/B18.pdf), 20 กุมภาพันธ์ 2554.
- วันชัย เกียรติพิมล. 2545. การผลิตและการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตและสารสกัดจากปลาจากวัสดุเศษเหลือโรงงานแปรรูปอาหารทะเลเป็นสารดึงดูดการกินอาหารของปลาเกล็ดเหลือง (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วิชัย ดำรง โภคภัณฑ์. 2555. เทคโนโลยีการนำเปลือกไข่มาใช้ประโยชน์. วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์. 11(2): 75-83.
- ศุภวรรณ กฤษณะทรัพย์. 2540. การลดปริมาณตะกั่วโดยใช้เปลือกไข่. วิทยานิพนธ์, มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์.
- สมาคมผู้ผลิต ผู้ค้า และส่งออกไข่ไก่. 2555. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2556: สรุปสถานการณ์ไข่ไก่ไทยปี 2555 และแนวโน้มปี 2556. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.
- สิวิกา กิจสวัสดิ์. 2548. โปรตีนไฮโดรไลเซตจากเลือดสุกร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สุปราณี เข้มพราย. 2539. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิเพื่อใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภาวดี ฟูกุล. 2542. **ขอสปรงรตจากโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทจากหัวปลาทูนำพันธุ์โอแอบ.**  
 วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุวรรณ เกษตรสุวรรณ. 2529. **ไข่และเนื้อไก่.** ตำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อลงกต ช้างเผือก. 2541. **การผลิตแคลเซียมคลอไรด์จากเปลือกไข่ไก่.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,  
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุดมรัตน์ สันติเกษมชัย. 2550. **การกำจัดเฮกซะวาเลนซ์โครเมียม (Cr<sup>6+</sup>) ในน้ำเสียโรงงานชุบโลหะ  
 โดยใช้เปลือกไข่และเยื่อเปลือกไข่.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

AOAC. 2000. **Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.**  
 17 th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

Adler-Nissen, J. 1986. **Enzymatic Hydrolysis of Food Protein.** Elsevier Applied Science,  
 London.

\_\_\_\_\_. 1993. Proteases, pp. 159-203. *In* T. Nagodawithana, and G. Reed, eds. **Enzymes  
 in Food Processing.** Academic Press, San Diego.

Anwar, R. A. 1990. Elastin: a brief review. **Biochem. Educ.** 18(4): 162-166.

Arias, J. L., M. S. Fernandez and J. E. Dennis. 1991. Collagen of the chicken eggshell  
 membranes. **Connect. Tissue Res.** 26: 37-45.

Baker, J. R. and D. A. Balch. 1962. A study of the organic material of hen's egg shell. **Biochem.  
 J.** 82: 352-361.

- Benjakul, S., C. Thongkaew and W. Visessanguan. 2005. Effect of reducing agents on physicochemical properties and gel-forming ability of surimi produced from frozen fish. **Eur. Food Res. Technol.** 220: 316-321.
- Board, R.G. and R. Fuller. 1994. **Microbiology of the Avian Egg**. Chapman and Hall, London.
- Carrino, D. A., J. E. Dennis, T. M. Wu, J. L. Arias, M. S. Fernandez, J. P. Rodriguez, D. J. Fink, A. H. Heuer and A. I. Caplan. 1996. The avian eggshell extracellular matrix as a model for biomineralization. **Connect. Tissue Res.** 35: 379-383.
- Chervan, M. and W. D. Deeslie. 1984. **Protein Hydrolysis**. U. S. Patent 4,443,540.
- Contesso, M. 1947. **Purified calcium carbobate from egg shell**. U.S.Patent 2,1419,822.
- Cordeiro C. M.M. and M.T. Hincke. 2011. Recent Patents on Eggshell: Shell and Membrane Applications. **Recent Pat Food Nutr. Agric.** 3: 1-81.
- Devore, D. P., L. F. Daniel, O. M. Paul, A. R. Gene and F. M. Robert. 2007. **Anti – Inflammatory Activity of eggshell membrane and processed eggshell membrane preparations**. U. S. Patent 20070178170 A1.
- Dong, Q., H. Su, D. Zhang, Z. Liu and Y. Lai. 2006. Synthesis of hierarchical mesoporous titania with interwoven networks by eggshell membrane directed sol-gel technique. **Micropor. Mesopor. Mat.** Article in Press, Corrected Proof.
- Etches, R. J. 1996. **Reproduction in Poultry**. Ocon: CAB international, Walling ford.
- Friess, W. 1998. Collagen – biomaterial for drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 45: 113-136.

- Gao, M.T., M. Hirata, E. Toorisaka and T. Hano. 2006. Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. **Bioresource Technol.** 97: 2414-2420.
- Hincke, M.T., U. J. Gautron, M. Panheleux, J. Garcia-Ruiz, M. D. McKee and Y. Nys. 2000. Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. **Matrix Biol.** 19: 443-453.
- Howell, N.K. 1996. Chemical and enzymatic modifications, pp. 235-280. In S. Nakai and H.W. Modler, eds. **Food Proteins: Properties and Characterization**. VCH Publishers, New York.
- Ishikawa, S.I., K. Suyama and I. Satoh. 1999. Biosorption of actinides from dilute waste actinide solution by eggshell membrane. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 77-79: 521-533.
- Je, J.Y., P.J. Park and S.K. Kim. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) Frame Protein Hydrolysate. **Food Res. Int.** 38(1): 45-50.
- Kaewmanee, T., S. Benjakul and W. Visessanguan. 2009. Changes in chemical composition physical properties and microstructure of duck egg as influenced by salting. **J. Food Chem.** 112: 560-569.
- Kaewmanee, T., S. Benjakul and W. Visessanguan. 2011. Effect of acetic acid and commercial protease pretreatment on salting and characteristics of salted duck egg. **Food Bioprocess Technol.** 5(5): 1502-1510.
- Karthikeyan, R., S. Balaji and P.K. Sehgal. 2007. Industrial applications of keratins-A review. **J. Sci. Ind. Res. India.** 66: 710-715.

- King'ori, A.M. 2011. A Review of the Uses of Poultry Eggshells and Shell Membranes. **Int. J. Poult. Sci.** 10(11): 908-912.
- Kodali, V. K., S. A. Gannon, S. Paramasivam, S. Raje, T. Polenova and C. Thorpe. 2011. A novel disulfide-rich protein motif from avian eggshell membranes. **PLoS ONE.** 6(3): 1-11. Available Source: <http://www.readcube.com/articles/10.1371/journal.pone.0018187>, December 8, 2013.
- Korhonen H. and A. Pihlanto. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality (Review). **Int. Dairy J.** 16: 945-960.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nat.** 227: 680-685.
- Leach, R. M., JR., R. B. Rucker and G. P., Van Dyke. 1981. Egg shell membrane protein: A nonelastin desmosine/isodesmosine-containing protein. **Arch. Biotechnol. Biophys.** 207(2): 353-359.
- Li-Chan, E. and H. Kim. 2008. Structure and chemical composition of eggs. *In*: Y. Mine, ed. **Egg Bioscience and Biotechnology.** John Wiley and Sons, Inc., United States of America.
- Liong, J. W. W., J.F. Frank, S. Bailey. 1997. Visualization of eggshell membranes and their interaction with *salmonella enteritidis* using confocal scanning laser microscopy. **J. food protect.** 60(9): 1022-1028.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Mine, Y. 2008. **Egg Bioscience and Biotechnology.** John Wiley and Sons, Inc., Canada.

- Nakano, T., N. I. Ikawa and L. Ozimek. 2003. Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. **Poult. Sci.** 82: 510-514.
- Nys, Y., J. Gautron, J. M. Garcia-ruiz and M. T. Hincke. 2004. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. **C. R. Pealevol.** 3: 549-562.
- Ockerman, H. W. and C. L. Hansen. 1988. Blood Utilization, pp. 232-255. *In* E. Horwood, ed. **Animal by Product Processing.** VCH Publishing, United state.
- Okubo, T., S. Akachi and H. Hatta. 1997. Structure of hen eggs and physiology of egg laying, pp.1-12. *In* T. Yamamoto, L.R. Juneja, H. Hatta and M. Kim, eds. **Hen Egg Their Basic and Applied Science.** CRC Press, United States of America.
- Paul, D. D., L. F. Daniel, O. M. Paul, A. R. Gene and F. M. Robert. 2007. **Anti-Inflammatory Activity of eggshell membrane and processed eggshell membrane preparations.** U. S. Patent 20070178170.
- Powrie, W. D. and S. Nakai. 1985. Characteristics of edible fluids of animal origin: Eggs. *In* O. R. Fennema, ed. **Food chemistry.** Marcel Dekker, New York.
- Pramanpol, N. and N. Nitayapat. 2006. Adsorption of reactive dye by eggshell and its membrane. **Kasetsart J. (Nat. Sci.) (Suppl.).** 40: 192-197.
- Price, N. C. 1996. **Proteins.** Labfax Academic Press, Oxford.
- Più L. D., A. Tassoni, D. I. Serrazanetti, M. Ferri, E. Babini and A. Gianotti. 2012. Exploitation of starch industry by-product to produce bioactive peptides from rice protein hydrolysates. **Environ. Eng. Manag. J.** 11(3).

- Randall, D., W. Burggren and K. French. 1997. **Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations**. 4<sup>th</sup> ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Ruff, K. J, D. P DeVore, M. D Leu and M. A Robinson. 2009. Eggshell membrane: A possible new natural therapeutic for joint and connective tissue disorders. Results from two open-label human clinical studies. **Clin. Interv. Aging**. 4: 235-240.
- Sarmadi, B. H. and I. Amin. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**. 31: 1949-1956.
- Sathivel, S., P. J. Bechtel, J. Babbitt, S. Smiley, C. Crapo, K. D. Reppond and W. Prinyawiwatkul. 2003. Biochemical and functional properties of Herring (*Clupea harengus*) by-product hydrolysates. **J. Food Sci.** 68(7): 2196-2200.
- Sharma S., S. Raghvendar and R. Shashank. 2011. Bioactive Peptides: A Review. **Int. J. Bioautomation**. 15(4): 223-250.
- Shimizu, T. 2012. Food-Derived Bioactive Peptides in the Market. pp. 375-394. In H. S. Navam, ed. **Food Protein and Peptides: chemistry, functionality, interactions and commercialization**. CRC Press, New York.
- Shoji, R., T. Miyazaki, T. Niinou, M. Kato and H. Ishii. 2004. Recovery of gold by chicken egg shell membrane-conjugated chitosan beads. **J. Mater. Cycles Waste Manag.** 6: 142-146.
- Simons, P. C. M. and G. Wiertz. 1963. Notes on the structure of membranes and shell in hen's egg an electron microscopical study. **Z Zellforsch. Mikrosk. Anat.** 59: 555-567.
- Stadelman, W. J. and O. J. Cotterill. 1977. **Egg Science and Technology**. AVI Publishing Company, Connecticut, USA.

- Suetsuna, K. 2000. Antioxidant peptides from the protease digest of Prawn (*Penaeus japonicus*) Muscle. **Mar. Biotechnol.** 2(1): 5-10.
- Sugano, M., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., and Kimoto, M. 1988. The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. **Atherosclerosis.** 72(2-3): 115-122.
- Takahashi, K., K. Shirai, M. Kitamura and M. Hattori. 1996. Soluble eggshell membrane proteins a regulating material for collagen matrix reconstruction. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 60(8): 1299-1302.
- Tan, C.K., T.W. Chen, H.L. Chan and L.S. Ng. 1992. A scanning and transmission electron microscopic study of the membranes of chicken egg. **Histol. Histopathol.** 7: 339-345.
- Tang, J., J. Li, J. Kang, L. Zhong and Y. Zhang. 2009. Preliminary studies of application of eggshell membrane as immobilization platform in sandwich immunoassay. **Sens. Actuat. B.** 140: 200-205.
- \_\_\_\_\_, Z. Liu, J. Kang and Y. Zhang. 2010. Determination of salbutamol using R-phycoerythrin immobilized on eggshell membrane surface as a fluorescence probe. **Anal. Bioanal. Chem.** 397: 3015-3022.
- \_\_\_\_\_, L. Han, Y. Yu, J. Kang and Y. Zhang. 2011. A label-free immunoassay using eggshell membrane as matrix and poly (diallyldimethylammonium chloride) as light-scattering enhancer. **Luminescence.** 26: 634-639.
- Torres, F. G., O. P. Troncoso, F. Piaggio and A. Hijar. 2010. Structure-property relationships of a biopolymer network: The eggshell membrane. **Acta Biomater.** 6: 3687-3693.

- Tung, M. A. and J. I. Richards. 1972. Ultrastructure of the hen's eggshell membranes by electron microscopy. **J. Food Sci.** 37: 277-279.
- Tullet, S.G. 1987. **Egg shell formation and quality**. Butterworth Co, Ltd., London.
- Verdenius, H. H. W. and L. Alma. 1958. A Quantitative Study of Decalcification Methods in Histology. **J. clin. Path.** 11: 229-236.
- Vlad, V. 2007. Avian egg shell membrane polypeptide extraction via fermentation process. U. S. Patent 0017447 A1.
- Wedral, E.M., D.V. Vadehra and R.C. Baker. 1974. Chemical composition of the cuticle and inner and outer membranes from egg of *Gallus gallus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 47B: 631-640.
- William, J. S. and J. C. Owen. 1995. **Egg science and technology**. 4<sup>th</sup> ed. Food Product Press, New York.
- Wong, M., M. J. C. Hendrix, K. von der Mark, C. Little and R. Stern. 1984. Collagen in the egg shell membranes of the Hen. **Dev. Biol.** 104: 28-36.
- Yi, F., Z. X. Guo, L. X. Zhang, J. Yu and Q. Li. 2003. Natural bioactive material: A preparation of soluble eggshell membrane protein. **Macromol. Biosci.** 3: 234-237.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 2004. Soluble eggshell membrane protein: Preparation, characterization and biocompatibility. **Biomater.** 25: 4591-4599.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 2007. Soluble eggshell membrane protein: Antibacterial property and biodegradability. **J. Wuhan Univ. Technol.** 22(1): 117-119.

Zhao, Y. and Y. Chi. 2009. Characterization of collagen from eggshell membrane. **Biotechnol.**  
8(2): 254-258.





ภาคผนวก



## 1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (2000)

### 1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1.1 ถ้วยอลูมิเนียม

1.1.2 ตู้อบลมร้อน

1.1.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.1.4 เเดซิเคเตอร์

### 1.2 วิธีการ

อบถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝาในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 4-5 กรัมลงในถ้วยอลูมิเนียม แล้วนำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์นำตัวอย่างออกมาชั่งหาน้ำหนัก อบซ้ำจนได้น้ำหนักของตัวอย่างคงที่คือให้น้ำหนักของผลต่างทั้งสองครั้งไม่เกิน 1 มิลลิกรัม

### 1.3 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

$$\text{ปริมาณของแข็ง (เปอร์เซ็นต์)} = 100 - \text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)}$$

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้วิธี Soxtec system ดัดแปลงจาก AOAC (2000)

### 2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน Soxtec System HT6

2.1.2 ชุดวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

- 2.1.3 เคชเคเตอร์
- 2.1.4 ตู้อบลมร้อน
- 2.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

## 2.2 สารเคมี

### 2.2.1 ปีโตรเลียมอีเทอร์

## 2.3 วิธีการ

เปิดเครื่องทำความเย็นให้อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เปิดเครื่องทำความร้อนรอให้เครื่องพร้อมทำงาน ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 5 กรัมใส่ใน thimble แล้วนำไปใส่ใน extraction unit นำปีโตรเลียมอีเทอร์ปริมาณ 60 มิลลิลิตรใส่ในถ้วย อลูมิเนียมที่ผ่านการอบชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำถ้วยอลูมิเนียมต่อเข้ากับ extraction unit ทำการสกัดนาน 20 นาที จากนั้นทำการล้าง 10 นาที และระเหยตัวทำละลายอีก 20 นาที นำถ้วย อลูมิเนียมไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเคชเคเตอร์ และชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

## 2.4 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W3 - W2}{W1} \times 100$$

- เมื่อ
- W1 = น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)
  - W2 = น้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมที่ผ่านการอบหาน้ำหนักที่แน่นอน (กรัม)
  - W3 = น้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมและไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

## 3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl ดัดแปลงจาก AOAC (2000)

### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ชุดเครื่องกลั่น Kjeltac 1026 Distilling unit

3.1.2 ชุดเครื่องย่อย Digestion System 1007

3.1.3 หลอดย่อย และ Tube stand

### 3.2 สารเคมี

3.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

3.2.2 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มัล

3.2.3 สารละลายกรดบอริก 2 เปอร์เซ็นต์

3.2.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์

3.2.5 สารเร่งปฏิกิริยา: คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม และโพแทสเซียมซัลเฟต 10 กรัม

3.2.6 สารละลายอินดิเคเตอร์ (ละลายเมธิลเรด 0.02 กรัม และ โบร โมครีซอลกรีน 0.1 กรัมในเอทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

3.2.7 ทริสบัฟเฟอร์

### 3.3 วิธีการ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.5 กรัมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงในหลอดย่อย เติมตัวเร่งปฏิกิริยา ใส่เม็ดลูกแก้วกันเดือด (glass bead) 2-3 เม็ด จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำหลอดต่อเข้ากับชุดย่อย ทำการย่อยจนได้สารละลายสีทึงไว้ให้เย็น นำหลอดย่อยต่อเข้ากับชุดเครื่องกลั่นเติมน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์จนกว่าสารละลายในหลอดย่อยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยใช้เวลากลั่นประมาณ 3 นาที รอรับสารละลายที่กลั่นได้ด้วยขวดรูปชมพู่ซึ่งมีสารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด นำสารละลายที่ได้ไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มัล จนได้สารละลายสีเทาซึ่งเป็นจุดยุติ ทำแบบลค์เปรียบเทียบโดยไม่ใส่ตัวอย่างในหลอดย่อย

สำหรับการหาค่าแฟลเคเตอร์ของกรดที่ใช้ในการไตเตรท ทำโดยชั่งทริสบัฟเฟอร์ 120 มิลลิกรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเทา

### 3.4 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(S-B) \times N \times f \times 1400}{W}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)} = \text{ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)} \times \text{nitrogen factor}$$

$$\text{แฟกเตอร์กรด (f)} = \frac{E}{121.14 \times N \times V}$$

- เมื่อ
- S = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
  - B = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรทแบลนค์ (มิลลิลิตร)
  - W = น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัม)
  - f = แฟกเตอร์ของกรดที่ใช้ในการไตเตรท
  - N = ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ไตเตรท (นอร์มัล)
  - V = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรททริสบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)
  - E = น้ำหนักของทริสบัฟเฟอร์ (มิลลิกรัม)

## 4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าตามวิธีของ AOAC (2000)

### 4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
- 4.1.2 เตาเผาไฟฟ้า (electric muffle furnace)
- 4.1.3 เคชิตเตอร์
- 4.1.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 4.1.5 ตะเกียงบุนเซ็น

### 4.2 วิธีการ

ซึ่งตัวอย่างแห้งประมาณ 5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่เผา และทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆ จนหมดควันสีดำ แล้วเผาต่อในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ  $550 \pm 20$  องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง จนได้เถ้าสีขาวหรือสีเทา ทิ้งไว้ให้เย็นในเคซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

#### 4.3 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้าที่เหลือ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}} \times 100$$

#### 5. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

วิธีคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต จากการหักลบออกจาก 100 เปอร์เซ็นต์

$$\text{เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} + \text{เปอร์เซ็นต์เถ้า} + \text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} + \text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน})$$



### การคำนวณเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ และเปอร์เซ็นต์ผลได้

นำส่วนใส (หลังการเหวี่ยงแยกและกรอง) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเชื้อเปลือกไข่ โดยสุ่มมาจำนวน 5 กรัม อบไล่ความชื้นที่ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักของแข็งที่เหลืออยู่ คำนวณเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ และเปอร์เซ็นต์ผลได้ดังนี้

$$\text{ของแข็งที่ละลายได้ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยและของแข็งหลังอบ} - \text{น้ำหนักถ้วย}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็งที่ละลายได้ในส่วนใสทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักของแข็งในเชื้อ 1.5 กรัม ก่อนย่อย}} \times 100$$



## การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

### 1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 หลอดทดลอง
- 1.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- 1.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 1.4 เครื่องปั่นผสมของเหลว

### 2. สารเคมี

- 2.1 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย ก)
- 2.2 สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย ข)
- 2.3 สารละลายโพแทสเซียมทาร์เตรต 2 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย ค)
- 2.4 สารละลาย ง โดยผสมสารละลาย ก: สารละลาย ข: สารละลาย ค ในอัตราส่วน 100:1:1
- 2.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มัล
- 2.6 สารละลายฟอลิน-ซีโอเคาทูลฟินอล 50 เปอร์เซ็นต์
- 2.7 สารละลายโบวายเซรัมอัลบูมินความเข้มข้น 50, 100, 250, 500, 1000 1500 และ 2000 มิลลิกรัม/ลิตร

### 3. วิธีการ

เจือจางตัวอย่างที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ใส่ตัวอย่างลงในหลอดทดลอง 0.3 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร นำสารละลายไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย ง ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาจึงเติมสารละลายฟอลิน-ซีโอเคาทูลฟินอล 0.3 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีเพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมินเพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีน

#### 4. ตัวอย่างการคำนวณ

ในการทดลองหาปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธี Lowry โดยเจือจางตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้สารรีดิวซิงเป็นแอล-ซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรต 0.5 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 4.5 มิลลิกรัม เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรเท่ากับ 0.394 จากค่าการดูดกลืนแสงเมื่อนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาพผนวกที่ 1 จะได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ  $0.394/0.0003 = 1313.33$  มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 1.313 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม นั่นคือไฮโดรไลเสตที่เจือจาง (ไฮโดรไลเสต 0.5 มิลลิกรัม + น้ำกลั่น 4.5 มิลลิกรัม) มีโปรตีน 1.313 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมหรือโปรตีนในสารละลายทั้งหมดปริมาตร 5 มิลลิกรัม มีโปรตีนเท่ากับ  $1.313 \times 5 = 6.565$  มิลลิกรัม แต่สารละลายนี้คือไฮโดรไลเสต 0.5 มิลลิกรัมเท่านั้นเพราะฉะนั้นไฮโดรไลเสต 1 มิลลิกรัมจึงมีโปรตีน เท่ากับ  $6.565 \div 0.5 = 13.13$  มิลลิกรัม นั่นคือความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเสตที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 13.13 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมไฮโดรไลเสต หรือคำนวณด้วยสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเสต (มิลลิกรัม/มิลลิกรัม)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times 5}{0.3 \times 0.5}$$

ในการทดลองหาปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธี Lowry โดยเจือจางตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้สารรีดิวซิงเป็น 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.5 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 4.5 มิลลิกรัม เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรเท่ากับ 0.323

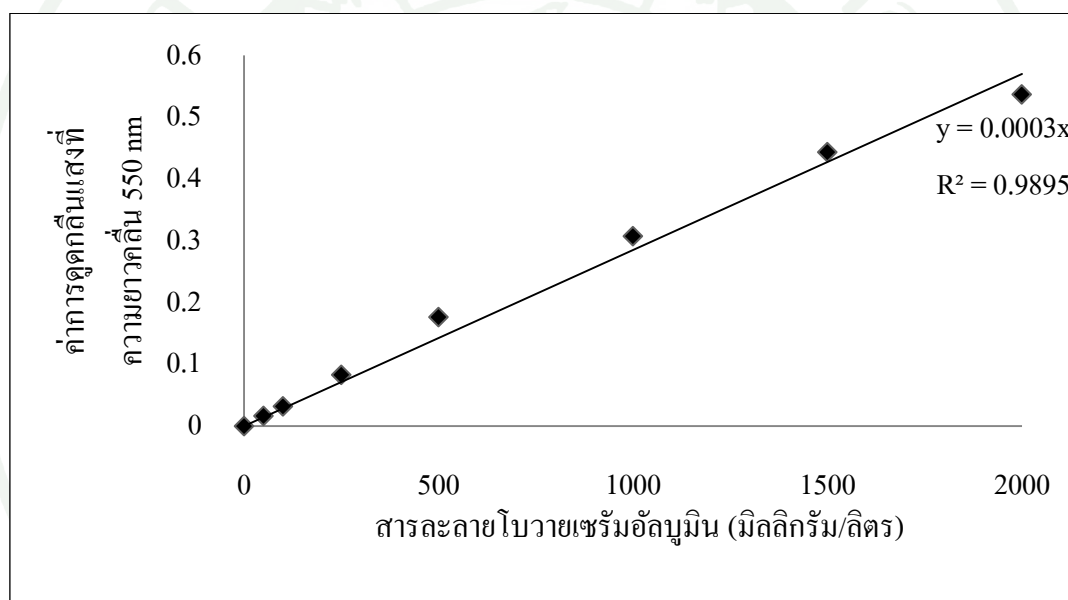
$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเสต (มิลลิกรัม/มิลลิกรัม)} = 10.76$$

ในการทดลองหาปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธี Lowry โดยเจือจางตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่เติมสารรีดิวซิง 0.5 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 4.5 มิลลิกรัม เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรเท่ากับ 0.350

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเสต (มิลลิกรัม/มิลลิกรัม)} = 11.66$$

## 5. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน

นำสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายง ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลายฟอลิน-ซี โอเคาทูลฟีนอล 0.3 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน (มิลลิกรัม/ลิตร) ได้กราฟดังภาพผนวกที่ ค1



ภาพผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน



**ภาคผนวก ง**

การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีน โดย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดย sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970)

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีน

2. สารเคมี

2.1 สารละลาย acrylamide (30 เปอร์เซ็นต์)/bis (0.8 เปอร์เซ็นต์) (ละลาย acrylamide 30 กรัม และ methylenebisacrylamide 0.8 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายและเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเก็บได้ไม่เกิน 30 วัน)

2.2 สารละลาย Tris-HCl 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8

2.3 สารละลาย Tris-HCl 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8

2.4 สารละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์

2.5 สารละลาย running buffer (ผสม Tris base 9 กรัม Glycine 43.2 กรัม และ SDS 3 กรัม ละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรเป็น 600 มิลลิลิตร)

2.6 สารละลายสีย้อม (ละลาย Coomassie brilliant blue R-250 1 กรัมในสารละลายที่มีส่วนผสมของเมทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสซิติค 10 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เป็น 1 ลิตร)

2.7 สารละลายล้างสีย้อม (ผสมเมทานอล 100 มิลลิลิตร กับกรดแอสซิติค 75 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น)

2.8 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

2.9 TEMED (N,N,N',N'-tetra ethylene diamine)

2.10 2-mercaptoethanol

2.11 กลีเซอรอล

2.12 สารละลายโบรโมไฟโนลบลู 1 เปอร์เซ็นต์

2.13 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน broad range ของบริษัท Bio-Rad เลขที่ 161-0363 ประกอบด้วยโปรตีน myosin (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116.25 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa) และ aprotinin (6.5 kDa)

### 3. วิธีการ

#### การเตรียมตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลายตัวอย่าง (sample buffer) โดยผสมน้ำปราศจากไอออน 3.8 มิลลิลิตร, สารละลาย Tris-HCl 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, กลีเซอรอล 0.8 มิลลิลิตร, สารละลาย SDS 10 เปอร์เซ็นต์ 1.6 มิลลิลิตร, 2-mercaptoethanol 0.4 มิลลิลิตร และสารละลายโบรโนฟินอลบลูความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 0.4 มิลลิลิตร
2. เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายตัวอย่างโดยเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้น โปรตีนเยื่อเปลือกไข่ไฮโดรไลเสด 30 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 4 ไมโครลิตร
3. นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ที่ทิ้งให้เย็นใช้สำหรับหยอดตัวอย่างลงบนแผ่นเจล

#### การเตรียมเจล

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจล
2. ประกอบแผ่นกระจกเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่นๆ ตามวิธีประกอบ โดยควรสวมถุงมือในการประกอบเครื่อง
3. เตรียมสารละลายของ separating gel อัตราส่วนตามตารางผนวกที่ ง1 ใช้ separating gel ที่ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ โดยการเตรียมสารละลายจะผสมส่วนประกอบข้อที่ 1-5 ก่อน (ตารางผนวกที่ ง1) และนำของผสมที่ได้ไปกำจัดอากาศ (degas) นาน 20 นาที แล้วจึงเติมส่วนประกอบข้อที่ 6 และ 7 ผสมให้เข้ากัน
4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายของเจลลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศให้เหลือระยะห่างจากขอบบนประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร และใช้ปิเปตค่อยๆ เติมน้ำกลั่นปิดทับผิวหน้าของเจล
5. ตั้งเจลทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แข็งตัวซึ่งใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที เมื่อเจลแข็งจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำค่อยๆ คูดน้ำกลั่นทิ้งไป และใช้กระดาษกรองซับผิวหน้าของเจล
6. เตรียมสารละลายของ stacking gel ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมส่วนประกอบในข้อ 1-5 (ตารางผนวกที่ ง1) จากนั้นนำของผสมที่ได้ไปกำจัดอากาศ (degas) นาน 20 นาที แล้วจึงเติมส่วนประกอบข้อที่ 6 และ 7 ผสมให้เข้ากัน

7. ใช้ปิเปตดูดสารละลายของเจลลงบน separating gel โดยอย่าให้มีฟองอากาศ ค่อยๆ สอดหวี (Teflon comb) ลงใน stacking gel โดยค่อยเติมสารละลายของเจลให้เต็ม ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่ อุณหภูมิห้องใช้เวลาประมาณ 30-40 นาที เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว จึงนำหวีออกจะได้ช่องสำหรับใส่ ตัวอย่างโปรตีน

#### การ Loading ตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลาย electrode buffer 600 มิลลิลิตร โดยผสมสารละลาย running buffer 120 มิลลิลิตรกับน้ำ 480 มิลลิลิตร
2. ต่อชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโพรสิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมสารละลาย electrode buffer ลงในภาชนะทั้งด้านบนและด้านในแต่อย่าให้ล้น chamber อันบนโดยการเทสารละลายพยายามอย่าให้มีฟองอากาศถ้ามีให้ใช้ปิเปตกวไลฟองอากาศ
3. ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 4 ไมโครลิตรลงในช่องใส่ตัวอย่าง
4. ปิดฝา chamber จากนั้นต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์
5. หยุดการจ่ายกระแสไฟเมื่อสีของสาร โบรโมฟินอลบลูเคลื่อนที่เกือบถึงปลายของ separating gel
6. นำแผ่นเจลออกจากอุปกรณ์ แล้วนำไปเชื่อมด้วยสารละลายสีย้อมนาน 45 นาที ล้างสารละลายสีย้อมด้วยสารล้างสีย้อมจนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางผนวกที่ ง1 อัตราส่วนสำหรับการเตรียม SDS-PAGE Separating gel และ Stacking gel

ส่วนประกอบ	Separating gel	Stacking gel
	(0.375M Tris, pH 8.8)	(0.125M Tris, pH 6.8)
	12 เปอร์เซ็นต์ gel	4 เปอร์เซ็นต์ gel
1. น้ำกลั่น	3.35 ml	6.1 ml
2. 1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	-
3. 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	-	2.5 ml
4. สารละลาย SDS 10 เปอร์เซ็นต์	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
5. สารละลาย acrylamide/bis (กำจัดอากาศ 20 นาที)	4 ml	1.33 ml
6. ละลายแอมโมเนียมเปอร์ ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
7. TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l



**ตารางผนวกที่ จ1** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้นของกรดแอสิดิก (0, 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์) ที่เวลา และอุณหภูมิในการแช่เปลือกไข่เพื่อแยกเยื่อเปลือกไข่ต่อค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้

SOV	df	MS	F	Sig.
ความเข้มข้นกรด	3	0.004	105.771	0.000*
เวลา	2	8.150E-5	1.922	0.157 <sup>ns</sup>
อุณหภูมิ	3	0.000	6.239	0.001*
ความเข้มข้น * เวลา	6	0.000	2.876	0.018*
ความเข้มข้น* อุณหภูมิ	9	3.543E-5	0.835	0.587 <sup>ns</sup>
เวลา* อุณหภูมิ	6	7.529E-5	1.775	0.124 <sup>ns</sup>
ความเข้มข้น* เวลา* อุณหภูมิ	18	8.301E-5	1.958	0.033*
ความผิดพลาด	48	4.241E-5		

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p > 0.05$ )

\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางผนวกที่ จ2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้นของกรดแอสซิดิก (0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์) ที่เวลา และอุณหภูมิในการแช่เปลือกไข่เพื่อแยกเยื่อเปลือกไข่ต่อค่าความหนาของเยื่อเปลือกไข่ที่แยกได้

SOV	df	MS	F	Sig.
ความเข้มข้นกรด	2	2.943E-5	0.746	0.482 <sup>ns</sup>
เวลา	2	0.000	5.473	0.008*
อุณหภูมิ	3	0.000	6.341	0.001*
ความเข้มข้น * เวลา	4	8.785E-5	2.226	0.086 <sup>ns</sup>
ความเข้มข้น* อุณหภูมิ	6	3.467E-5	.878	0.520 <sup>ns</sup>
เวลา* อุณหภูมิ	6	0.000	4.412	0.002*
ความเข้มข้น* เวลา* อุณหภูมิ	12	4.823E-5	1.222	0.306 <sup>ns</sup>
ความผิดพลาด	36	3.947E-5		

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p > 0.05$ )

\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางผนวกที่ จ3 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการแช่เปลือกไข่ต่อค่าความหนาที่สารละลายกรด  
แอซีติกความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ		ความหนาของเยื่อเปลือกไข่ <sup>1</sup> (มิลลิเมตร)		
กรดแอซีติก (โมลาร์)	อุณหภูมิ (°ซ)	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
0.5	28	0.076±0.000 <sup>aA</sup>	0.082±0.000 <sup>bA</sup>	0.092±0.002 <sup>cA</sup>
	45	0.082±0.004 <sup>aA</sup>	0.101±0.004 <sup>aB</sup>	0.088±0.023 <sup>aA</sup>
	60	0.088±0.009 <sup>aA</sup>	0.092±0.006 <sup>aAB</sup>	0.087±0.004 <sup>aA</sup>
	70	0.081±0.004 <sup>aA</sup>	0.091±0.001 <sup>aAB</sup>	0.085±0.011 <sup>aA</sup>
1.0	28	0.071±0.001 <sup>aA</sup>	0.082±0.000 <sup>bA</sup>	0.097±0.001 <sup>cA</sup>
	45	0.091±0.002 <sup>aB</sup>	0.086±0.009 <sup>aA</sup>	0.092±0.001 <sup>aA</sup>
	60	0.095±0.006 <sup>aB</sup>	0.088±0.006 <sup>aA</sup>	0.089±0.003 <sup>aA</sup>
	70	0.087±0.004 <sup>aB</sup>	0.089±0.008 <sup>aA</sup>	0.093±0.009 <sup>aA</sup>
1.5	28	0.072±0.001 <sup>aA</sup>	0.087±0.001 <sup>bA</sup>	0.089±0.000 <sup>bA</sup>
	45	0.089±0.002 <sup>bB</sup>	0.082±0.001 <sup>aA</sup>	0.095±0.001 <sup>cA</sup>
	60	0.104±0.004 <sup>aC</sup>	0.094±0.013 <sup>aA</sup>	0.092±0.001 <sup>aA</sup>
	70	0.087±0.006 <sup>aB</sup>	0.084±0.003 <sup>aA</sup>	0.095±0.006 <sup>aA</sup>

<sup>1</sup>ความหนาของเยื่อเปลือกไข่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอย่างจำนวน 3 ซีน วัด  
ซึ้นละ 3 ตำแหน่ง

ตัวอักษร A, B, C ที่แตกต่างกันในแนวตั้งของความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ความเข้มข้นเดียวกัน  
แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  
( $p \leq 0.05$ )



ภาคผนวก ฉ

การคำนวณปริมาณเชื้อเปลือกไข่ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

### การคำนวณปริมาณเยื่อเปลือกไข่ที่ต้องใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่ในสารละลายกรดแอซีติก พบว่า มีความชื้น 56.50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงมีเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 43.5 และมีเปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 94.64 (เทียบกับน้ำหนักส่วนที่เป็นของแข็งในเยื่อ) ดังนั้นถ้าต้องการไฮโดรไลเสตผงปริมาณ 1 กรัม จะต้องใช้เยื่อเปลือกไข่ปริมาณเท่าใด สามารถคำนวณได้ดังนี้

ของแข็ง 43.5 กรัม มาจากเยื่อเปลือกจำนวน 100 กรัม

ถ้าของแข็ง 100 กรัม จะมาจากเยื่อเปลือกจำนวน  $100 \times 100 / 43.5 = 229.89$  กรัม

ซึ่งเยื่อเปลือก 229.89 กรัม จะมีของแข็งที่ละลายได้ 94.64 กรัม

ดังนั้น ไฮโดรไลเสตผง 94.64 กรัม จะมาจากเยื่อเปลือก 229.89 กรัม

ไฮโดรไลเสตผง 1 กรัม จะมาจากเยื่อเปลือกจำนวน  $229.89 \times 1 / 94.64 = 2.43$  กรัม

และมาจากเปลือกไข่จำนวนเท่าใด ซึ่งเปลือกไข่ที่ใช้ในการทดลองนี้ 1 ฟองมีน้ำหนัก 6.8 กรัม และมีเยื่อเปลือกไข่จำนวน 4 เปอร์เซ็นต์ของเปลือกทั้งฟอง ดังนั้น

เปลือกไข่น้ำหนัก 100 กรัม จะมีเยื่อเปลือกไข่ 4 กรัม

ถ้าเปลือกไข่น้ำหนัก 6.8 กรัม จะมีเยื่อเปลือกไข่  $4 \times 6.8 / 100 = 0.272$  กรัม

ถ้าเยื่อเปลือกไข่ 0.272 กรัม มาจากเปลือกไข่น้ำหนัก 6.8 กรัม

ถ้าเยื่อเปลือกไข่ 2.43 กรัม มาจากเปลือกไข่น้ำหนัก  $6.8 \times 2.43 / 0.272 = 60.75$  กรัม

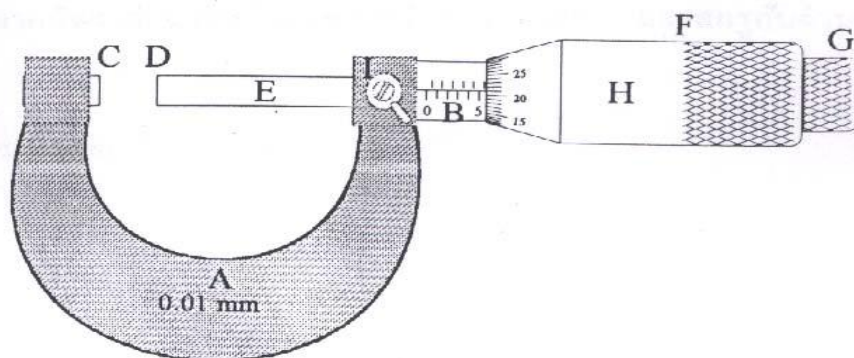
ดังนั้น ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ถ้าต้องการไฮโดรไลเสตผงปริมาณ 1 กรัม จะต้องใช้เยื่อเปลือกไข่ปริมาณ 2.43 กรัม ซึ่งมาจากเปลือกไข่ปริมาณ 60.75 กรัม หรือมาจากไข่ประมาณ 9 ฟอง (เทียบจากไข่ 1 ฟองที่ใช้ในการทดลองมีเปลือกหนัก 6.8 กรัม)



ภาคผนวก ข  
การใช้ไมโครมิเตอร์

## การใช้ไมโครมิเตอร์

ไมโครมิเตอร์ (Micrometer) เป็นเครื่องมือวัดขนาดของวัตถุที่ต้องการความละเอียดสูงในระดับทศนิยม 3 ตำแหน่งของมิลลิเมตร เครื่องมือวัดชนิดนี้อาศัยหลักการ การเคลื่อนที่ของสกรู ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญ ดังแสดงในภาพผนวกที่ ข1



ภาพผนวกที่ ข1 ส่วนประกอบของไมโครมิเตอร์

ที่มา: บัญชา และคณะ (2537)

โครง A	มีลักษณะคล้ายคันธนูหรือตะขอเกี่ยว โครง A นี้มีปากวัด C และสเกลนอน B ติดอยู่
แกนสเกลนอน B	แบ่งสเกลเป็นมิลลิเมตร และด้านบนมีขีดบอกระยะครึ่ง มิลลิเมตรกำกับอยู่ทุกช่อง สเกลนี้ถือเป็นสเกลหลัก
แกนวัด E	ติดกับปลอกวัด F และปุ่ม G เมื่อหมุนปุ่ม G ทั้งแกนวัด I ปลอกวัด F และปุ่ม G จะเคลื่อนที่ไปบนโครง A
ปากวัด D	เป็นส่วนปลายสุดของแกนวัด ปากวัด D และ C เป็นผิวราบเกลี้ยงตัดตรง สำหรับใช้หนีบวัตถุที่ต้องการวัดขนาด
สเกลวงกลม H	อยู่ตรงขอบโดยรอบปลอกวัด แบ่งเป็นช่องกว้างเท่าๆกัน มีทั้งหมด 50 ช่อง ( $n = 50$ )
ปุ่ม G	ใช้หมุนเพื่อนำแกนวัด I ไปสัมผัสกับผิววัตถุ ซึ่งนำมาไว้วัด D สัมผัสพอดีกับวัตถุ จะมีเสียงดังกริ๊กเบาๆ

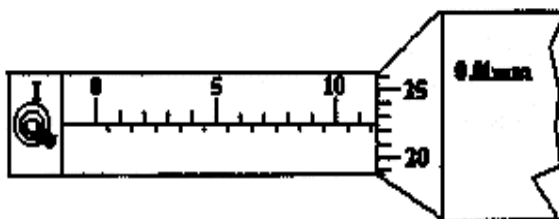
แสดงว่า สปริงรับแรงกดพอดีแกนวัดจะไม่เดินหน้าอีก  
ต่อไป เราก็อ่านค่าจากสเกลได้

ปุ่ม I

ใช้ตรึงแกนวัด ปลอกวัด และปุ่ม G ให้ติดกับ โครง A ทำ  
ให้สเกลไม่เลื่อนตำแหน่งขณะอ่าน เวลาใช้จะต้องบิดไป  
ทางซ้ายสุด

**วิธีการใช้ไมโครมิเตอร์:** หมุนแกน G ให้แกนวัดลอยหลัง เพื่อให้ปาก C-D เปิดกว้างกว่า  
ขนาดของวัตถุเล็กน้อย แล้วนำวัตถุที่จะวัดขนาดไปไว้ระหว่างปาก C-D ให้ด้านหนึ่งชิดปากวัด C  
ไว้ แล้วหมุนแกน G ให้ปากวัด D มาสัมผัสพอดีกับผิวด้านหนึ่งของวัตถุ โดยสังเกตจากเสียงกรีก  
เบาๆ จากนั้นให้บิดปุ่ม I ไปทางซ้ายเพื่อตรึงแกนวัดไว้ แล้วอ่านค่าการวัดได้

**การอ่านค่าการวัดบนสเกลไมโครมิเตอร์:** เมื่อวัดขนาดของวัตถุอันหนึ่ง ดังแสดงในภาพ  
ผนวกที่ ข2 โดยที่ Least Count ของไมโครมิเตอร์ = 0.010 mm. (ถ้าหมุนแกนวัดลอยหลังไปเพียง 1  
ช่อง ปากวัด C-D จะห่างกันเป็นระยะทาง  $0.5/50 = 0.010$  mm. ซึ่งเป็นค่าที่น้อยที่สุดที่สามารถอ่าน  
ได้จากเครื่องวัดชนิดนี้ เรียกว่า Least Count โดยปกติค่า Least Count ของไมโครมิเตอร์ จะเขียนไว้  
บนโครง A)



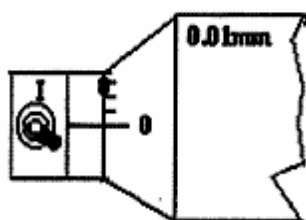
ภาพผนวกที่ ข2 ตัวอย่างสเกลบนไมโครมิเตอร์ที่วัดได้

ที่มา: ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล (ม.ป.ป.)

1. ขณะนี้ขอบของสเกลวงกลมอยู่ที่ตำแหน่ง 11.500 มิลลิเมตร เลยออกมาเล็กน้อยบนสเกลหลัก
2. ซีดที่ 22.5 ของสเกลวงกลมตรงกับแกนบนบนสเกลหลัก แล้วเอาตัวเลข 22.5 นี้คูณกับค่า Least Count จะได้เป็นค่าเศษของมิลลิเมตร เป็น  $22.5 \times 0.010 = 0.225$  mm.
3. นำค่าที่ได้จากข้อ 1. และข้อ 2. รวมกัน จะได้เป็นผลการวัดครั้งนี้ นั่นคือ

$$\text{ผลการวัด} = 11.500 \text{ mm.} + 0.225 \text{ mm.} = 11.725 \text{ mm.}$$

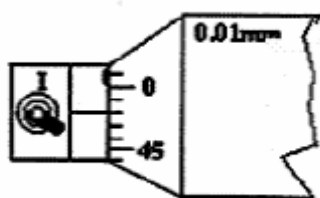
**ความคลาดเคลื่อนของไมโครมิเตอร์ (Zero Error):** ไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน เมื่อปากวัด C-D สัมผัสพอดี จุดที่ศูนย์กลางของสเกลวงกลมจะทับกับแกนนอนของสเกลหลัก และขอบของสเกลวงกลมจะทับขีดที่ศูนย์กลางของสเกลหลักพอดี ดังแสดงในภาพผนวกที่ ๓3



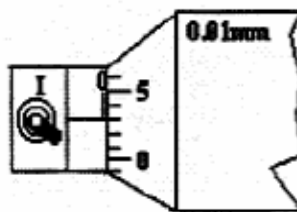
**ภาพผนวกที่ ๓3** ตัวอย่างไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน

ที่มา: ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล (ม.ป.ป.)

แต่ในบางครั้งอาจจะเกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นได้ ดังกรณีในภาพผนวกที่ ๓4 (4.1) เมื่อใช้วัดของสิ่งใดแล้วจะได้ค่าน้อยกว่าความเป็นจริงอยู่ 0.020 มิลลิเมตร เสมอ ดังนั้นเมื่ออ่านค่าการวัดใดๆ แล้วจึงต้องบวกด้วย 0.020 มิลลิเมตร เข้าไปด้วย และสำหรับในกรณีภาพผนวกที่ ๓4 (4.2) เมื่อใช้วัดสิ่งใดแล้วจะได้ค่ามากกว่าความเป็นจริงอยู่ 0.030 มิลลิเมตร ดังนั้นเมื่ออ่านค่าการวัดใดๆแล้วจึงต้องลบออกด้วย 0.030 มิลลิเมตร เสมอ



4.1



4.2

**ภาพผนวกที่ ๓4** ตัวอย่างไมโครมิเตอร์ที่อยู่ในสภาพไม่พร้อมใช้งาน

ที่มา: ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล (ม.ป.ป.)

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวคณุนารถ พิกุล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	29 มิถุนายน 2530
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลราชวิถี จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร) ภาควิชา เทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	คณุนารถ พิกุล, วรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร และ สายพิณ ทานัชมาสัย. 2557. การพัฒนาโปรตีนไฮโดรไล เสตจากเชื้อเปลือกไข่. น. 82-89. ใน การประชุมทางวิชาการ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 (สาขา อุตสาหกรรมเกษตร). 4-7 กุมภาพันธ์ 2557. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-