

การสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กรดอินทรีย์

วัลย์พร โพนคำ¹⁾ กุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์¹⁾ และอาภาสรา แสงนาค²⁾

1) ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2) ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

Email: arpaths@buu.ac.th.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้กรดอินทรีย์ มีการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ด้วยเครื่องแยกซึ่งอาศัยการลอยตัวในน้ำของเยื่อเปลือกไข่ แปรปริมาณเปลือกไข่ที่ใช้แยกเป็น 300, 500, 700, 900 และ 1,100 กรัม ร่วมกับการใช้ EDTA 5% แช่วเปลือกไข่ก่อนการแยกเปรียบเทียบกับเปลือกไข่ที่ไม่ได้แช่ พบว่าการแช่เปลือกไข่ด้วย EDTA 5% ช่วยแยกเยื่อเปลือกไข่ออกมามากกว่าเปลือกไข่ที่ไม่ได้แช่ ($p < 0.05$) และปริมาณเปลือกไข่ที่สามารถแยกเยื่อเปลือกไข่ออกมาได้มากที่สุดคือ 500 กรัม ต่อมาศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่โดยใช้ acetic acid 0.5 M และ citric acid 0.5 M โดยแปรอัตราส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อกรดอินทรีย์ดังนี้คือ 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 พบว่าที่อัตราส่วน 1:8 สามารถสกัดคอลลาเจนออกมามากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การใช้ 0.5 M acetic acid และ 0.5 M citric acid สกัดคอลลาเจนได้ 507 และ 495 มิลลิกรัมต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัม ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ชนิดของคอลลาเจนที่สกัดได้จากเยื่อเปลือกไข่ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเป็นคอลลาเจน Type I ซึ่งประกอบด้วย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$

คำสำคัญ: เยื่อเปลือกไข่, คอลลาเจน, เปลือกไข่

1. บทนำ

ไข่ประกอบด้วยสารอาหารโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและราคาไม่แพง จึงมีการแปรรูปไข่ในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ มาก ได้แก่ อุตสาหกรรมไข่ผง อุตสาหกรรมไข่เหลว การแปรรูปไข่ที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้มีเปลือกไข่เหลือทิ้ง จากรายงานของ คุณนิมิต อินทรสุข ผู้จัดการโรงงานแปรรูปไข่เหลว บริษัทกรุงเทพผลิตผลอุตสาหกรรมการเกษตร จำกัด (มหาชน) พบว่าโรงงานมีเปลือกไข่ไก่เหลือทิ้งประมาณวันละ 1 ตัน

เนื่องจากเปลือกไข่มีแคลเซียมประมาณร้อยละ 39 โดยน้ำหนัก (Cortivo และคณะ, 1982) จึงสามารถนำเปลือกไข่มาใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมในอาหารสัตว์ซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการค่อนข้างสูง จากรายงานของอลงกต (2541) พบว่า เปลือกไข่มีเยื่อเปลือกไข่เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก และเยื่อเปลือกไข่ที่มีคอลลาเจนประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของเยื่อเปลือกไข่ (MacNeil, 2001) โดยส่วนใหญ่

ประกอบด้วยคอลลาเจน type I, V และ X (Candish และ Scougall, 1969; Arias และคณะ, 1991) ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จาก คอลลาเจนอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและยา รวมทั้งอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น เป็นวัตถุดิบในการผลิตไส้สังเคราะห์สำหรับผลิตภัณฑ์ใส่กรอก ใช้ผลิตฟิล์มเคลือบอาหาร ใช้ในการผลิตคอนแทกเลนส์ชนิดอ่อน ใช้ในการผ่าตัดตกแต่งผิวหนังและชะลอความแก่หรือลดรอยเหี่ยวย่นของผิวหนังได้เป็นต้น (Walter และคณะ, 1998) โดยคอลลาเจนที่ใช้ในปัจจุบันถูกสกัดมาจากหนังวัวและหนังหมู ซึ่งหนังวัวอาจมีความเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อโรคแอนแทรกซ์จากวัวได้ ส่วนหนังหมูมีข้อจำกัดในการใช้เนื่องจากอิทธิพลทางศาสนา (Sadowska และ คณะ, 2003) จึงน่าจะมีการวิจัยเพื่อศึกษาวิธีการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่และศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัด คอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจและการใช้ประโยชน์จากเปลือกไข่ไก่

2.3.5 วิเคราะห์ Thermal solubility

นำเยื่อเปลือกไข่จากข้อ 2.2 น้ำหนัก 2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น และ NaCl 0.45 M นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิต่างๆ กันในช่วง 0-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำส่วนของเหลวชั้นบนมา วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนด้วยเครื่อง HPLC จากนั้น convert ปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนเป็นปริมาณคอลลาเจนดังสมการ (1)

2.3.6 วิเคราะห์ชนิดของคอลลาเจน

วิเคราะห์ชนิดคอลลาเจนโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Goncalves-Note และคณะ (2002)

2.3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการวิเคราะห์แบบ Completely randomized design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่แตกต่างโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 ผลการศึกษาภาวะและวิธีที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่

3.1.1 การออกแบบเครื่องแยกเยื่อเปลือกไข่

หลักการลอยตัวในน้ำพบว่า เยื่อเปลือกไข่ลอยอยู่บนผิวน้ำ ในขณะที่เปลือกไข่จมอยู่ก้นภาชนะ จากการออกแบบเครื่องแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ มีถึงกวนขนาดบรรจุ 20 ลิตร บรรจุน้ำได้ 15 ลิตร, ใบกวน (paddle) หมุนด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ถึงแยกขนาดบรรจุ 20 ลิตร ด้านบนถึงแยกมีตะแกรงคอยแยกเยื่อเปลือกไข่ที่ออกมาคือน้ำล้นจากถังกวน, บั๊มน้ำ ช่วยปั๊มน้ำจากถังแยกไปสู่ถังกวนเพื่อให้เกิดน้ำล้นในระบบหมุนเวียน

3.1.2 ภาวะที่เหมาะสมในการแยกเยื่อเปลือกไข่

การทดลองแยกเยื่อเปลือกไข่ด้วยเครื่องแยกพร้อมกับแช่เปลือกไข่ด้วยสารละลาย EDTA ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอัตราส่วนระหว่างเปลือกไข่ต่อสารละลาย EDTA เป็น 1 ต่อ 2 พบว่าการแช่เปลือกไข่ด้วย EDTA สามารถแยกเยื่อเปลือกไข่ได้สูงกว่าการไม่ได้แช่เปลือกไข่ใน EDTA ($p < 0.05$)

ศึกษาปริมาณเปลือกไข่ที่ใช้แยกด้วยเครื่อง พบว่าเปลือกไข่หนัก 500 กรัม เป็นปริมาณที่สามารถแยกเยื่อเปลือกไข่ได้มากที่สุด โดยสามารถแยกเยื่อเปลือกไข่ได้ร้อยละ 7.5 รองลงมาเป็นเปลือกไข่หนัก 300 และ 700 กรัม ที่แยกเยื่อเปลือกไข่ได้ร้อยละ 6.7 และ 6.3 ตามลำดับ ส่วนเปลือกไข่หนัก 900 และ 1100 กรัม แยกเยื่อเปลือกไข่ออกมาได้น้อยที่สุด ทั้งเนื่องจากเปลือกไข่ซึ่งมีปริมาณมากเกินไปจนไปกดทับเยื่อเปลือกไข่

3.2 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนออกจากเยื่อเปลือกไข่ด้วยกรดอินทรีย์

3.2.1 เยื่อเปลือกไข่

องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อเปลือกไข่ซึ่งมีความชื้นประมาณร้อยละ 78 โปรตีนประมาณร้อยละ 19, เกลือร้อยละ 2, คาร์โบไฮเดรตและไขมันในปริมาณน้อยมาก

3.2.2 ผลการใช้กรดอะซิติก

อัตราส่วนของเยื่อเปลือกไข่ต่อสารละลายที่เพิ่มมากขึ้น สามารถสกัดคอลลาเจนได้เพิ่มสูงขึ้นด้วยตามลำดับ จากตารางผลการทดลองที่ 1 แสดงให้เห็นว่าที่อัตราส่วนระหว่างเยื่อเปลือกไข่ต่อสารละลายเป็น 1:8 สามารถสกัดคอลลาเจนได้มากกว่าที่อัตราส่วน 1:4 และ 1: 6 ประมาณ 4 และ 2 เท่าตามลำดับ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 1 สกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 M

เยื่อเปลือกไข่ : รอบที่		ปริมาณ (mg/ 100 g dry sample)	
กรดอะซิติก	สกัด	กรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน	คอลลาเจน
(w/v)			
1:4	I	3.22 ± 0.30	41.60 ± 3.43
	II	2.77 ± 0.50	42.53 ± 7.95
	III	2.47 ± 0.29	45.10 ± 4.19
	Σ	8.46 ± 0.37	129.22 ± 1.81 ^b
1:6	I	7.46 ± 1.46	89.69 ± 6.04
	II	6.30 ± 0.26	97.56 ± 1.60
	III	5.78 ± 0.32	90.14 ± 2.85
	Σ	19.54 ± 0.85	277.38 ± 4.42 ^b
1:8	I	12.45 ± 0.99	160.78 ± 4.24
	II	11.30 ± 0.42	178.16 ± 8.24
	III	10.90 ± 0.46	167.73 ± 1.87
	Σ	34.65 ± 0.80	506.67 ± 8.74 ^a
1:10	I	12.77 ± 0.29	178.13 ± 9.33
	II	10.80 ± 0.74	164.07 ± 8.56
	III	10.38 ± 0.39	156.28 ± 6.52
	Σ	33.94 ± 1.27	498.48 ± 11.0 ^a

a, b. หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

collagen = hydroxyproline amino x 14.7

นอกจากนี้ผลของการเพิ่มอัตราส่วนจาก 1:8 เป็น 1:10 สามารถสกัดคอลลาเจนได้โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) แต่การใช้กรดอะซิติกในอัตราส่วนที่มาก มีกลิ่นฉุน (Sadowska และคณะ, 2003) ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่คือ 1: 8 โดยสามารถสกัดคอลลาเจนได้ประมาณ 506 มิลลิกรัมต่อเยื่อเปลือกไข่แห้ง 100 กรัม

3.2.2 ผลการใช้กรดซิตริก

การสกัดคอลลาเจนในอัตราส่วนของเยื่อเปลือกไข่ต่อสารละลายกรดซิตริก โดยเพิ่มอัตราส่วนเป็น 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนจาก 1:4 ถึง 1:8 สามารถสกัดคอลลาเจนได้เพิ่มสูงขึ้น โดยที่อัตราส่วน 1:8 สามารถสกัดคอลลาเจนได้มากกว่าการใช้อัตราส่วน 1:4 และ 1:6 ประมาณ 4 และ 1.5 เท่าตามลำดับ ($p < 0.05$) แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนในการสกัดจาก 1:8 เป็น 1:10 พบว่าสกัดคอลลาเจนได้ลดลงถึงร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 เนื่องจากคอลลาเจนละลายได้ในกรดซิตริกอย่างจำกัดตามรายงานของ Sadowska และคณะ, (2003) ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่คือ 1: 8 โดยสามารถสกัดคอลลาเจนได้ประมาณ 495 มิลลิกรัมต่อเยื่อเปลือกไข่แห้ง 100 กรัม

ตารางที่ 2 การสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ด้วยกรดซิตริกเข้มข้น 0.5 M

เยื่อเปลือกไข่ : กรดซิตริก (w/v)	รอบที่สกัด	ปริมาณ (mg/100 g dry sample)	
		กรดอะมิโนไฮดรอกซี-โพรลีน	คอลลาเจน
1:4	I	4.72 ± 1.08	69.38 ± 2.81
	II	2.50 ± 0.45	36.75 ± 5.34
	III	0.96 ± 0.12	14.11 ± 2.58
	Σ	8.18 ± 1.88	120.25 ± 5.87 ^c
1:6	I	6.51 ± 2.75	95.70 ± 7.71
	II	5.84 ± 1.85	85.84 ± 9.39
	III	4.35 ± 2.85	63.94 ± 13.53
	Σ	16.70 ± 2.25	245.50 ± 85.04 ^b
1:8	I	11.22 ± 2.84	165.01 ± 4.70
	II	11.74 ± 2.25	172.68 ± 9.27
	III	10.71 ± 1.02	157.52 ± 12.23
	Σ	33.68 ± 0.72	495.10 ± 29.86 ^a
1:10	I	8.11 ± 2.13	119.22 ± 7.71
	II	7.32 ± 1.89	107.60 ± 9.39
	III	6.43 ± 1.31	94.52 ± 13.53
	Σ	21.86 ± 0.84	321.34 ± 14.04 ^b

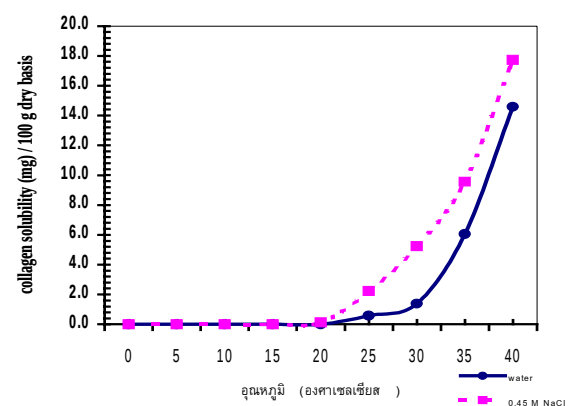
a, b... หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

collagen = hydroxyproline amino x 14.7

เมื่อเปรียบเทียบคอลลาเจนที่สกัดได้ในแต่ละรอบที่อัตราส่วนของเยื่อเปลือกไข่ต่อกรดอะซิติกต่างๆ กัน คือ 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 พบว่า คอลลาเจนที่สกัดได้ในแต่ละรอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) สำหรับผลการสกัดด้วยกรดซิตริก พบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างเยื่อเปลือกไข่ต่อกรดซิตริกเป็น 1:4, 1:6 และ 1:10 คอลลาเจนที่สกัดได้ในแต่ละรอบลดลง โดยในรอบที่ 1 สามารถสกัดคอลลาเจนออกมาได้มากที่สุด รองลงมาเป็นรอบที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ในขณะที่การใช้อัตราส่วนที่ 1:8 นั้น คอลลาเจนที่สกัดได้ในแต่ละรอบไม่แตกต่างกัน ($p \geq 0.05$)

3.2.3 ผลการวิเคราะห์ Thermal solubility

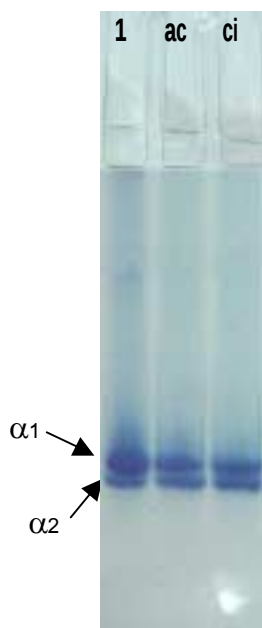
จากรายงานของ Montero และคณะ (1995) รายงานว่าที่อุณหภูมิมากกว่า 35 องศาเซลเซียส คอลลาเจนจะเกิดการแปรสภาพไป จากภาพที่ 2 แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ความร้อนกับเยื่อเปลือกไข่มากกว่า 30 องศาเซลเซียส การละลายของคอลลาเจนในเยื่อเปลือกไข่เพิ่มมากขึ้น และคอลลาเจนเกิดการแปรสภาพไป ดังนั้นขั้นตอนการสกัดคอลลาเจนควรทำที่อุณหภูมิต่ำในช่วง 0-15 องศาเซลเซียส ตามรายงานของ Sadowska และคณะ, (2003) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวทำละลายที่แตกต่างกันมีผลต่อค่า collagen solubility โดยพบว่าคอลลาเจนในเยื่อเปลือกไข่ละลายใน NaCl 0.45 M ได้มากกว่าน้ำ สอดคล้องกับรายงานของ Bode (2000) พบว่าคอลลาเจนละลายได้ดีในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำๆ



ภาพที่ 2 กราฟเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการละลายได้ของคอลลาเจนในเยื่อเปลือกไข่

3.2.4 ผลการวิเคราะห์ชนิดของคอลลาเจน

จากการวิเคราะห์แยกชนิดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ด้วย SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนที่พบในเยื่อเปลือกไข่เป็นคอลลาเจน type I ซึ่งประกอบด้วย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ โดยสอดคล้องกับรายงานของ Wong และคณะ (1984) แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 รูปแบบโปรตีนที่ได้จากการทำ SDS-PAGE ของคอลลาเจนในเยื่อเปลือกไข่

Lane 1 คือ คอลลาเจน type I มาตรฐาน

Lane ac คือ คอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ที่สกัดด้วยกรดอะซิติก

Lane ci คือ คอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ที่สกัดด้วยกรดซิตริก

4. สรุปผลการทดลอง

ปริมาณเปลือกไข่ที่เหมาะสมสำหรับเครื่องแยก ซึ่งสามารถบรรจุน้ำได้ 15 ลิตร ใบกวนมีความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที คือ เปลือกไข่ 500 กรัม และในการแยกเยื่อเปลือกไข่ออกจากเปลือกไข่ต้องแช่ EDTA ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอัตราส่วนระหว่างเยื่อเปลือกไข่ต่อสารละลายเท่ากับ 1:2

อัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อหุ้มเปลือกไข่ คือ เยื่อเปลือกไข่: สารละลายกรดอินทรีย์ เท่ากับ 1:8 โดยใช้กรดอะซิติกและกรดซิตริกสามารถสกัดคอลลาเจนได้ประมาณ 507 และ 495 มิลลิกรัมต่อเยื่อเปลือกไข่แห้ง 100 กรัมตามลำดับ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณบริษัทกรุงเทพผลิตผลอุตสาหกรรมเกษตร จำกัด (มหาชน) และงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการโครงงานอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาตรี ประจำปี 2546

6. เอกสารอ้างอิง

อลงกต ช้างเผือก. 2541. วิทยานิพนธ์เรื่องการผลิตแคลเซียมคลอไรด์จากเปลือกไข่ไก่. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

Bode, M. 2002. Characterization of type I and type III collagens in human tissues. Oulu, Finland.

Candish, J. K., and Scougall, R.K. 1969. L-5-hydroxylysine as a constituent of the shell membranes of the hen's egg. International Journal of Protein Research. 1: 299.

Cortivo, R., Castellani, I., Martelli, M., Michelotto, G., Abatangelo, G. 1982. Chemical characterization of the hen eggshell matrix: isolation of an alkaline-resistant peptide. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 4883-4889.

Dunphy, M.J., Bhide, M.V. and Smith, D.J. 1987. Determination of hydroxyproline in tissue collagen hydrolysate by derivatisation and isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography. 420: 394-397.

Goncalves-Note, J., Witzel, S.S., Teodoro, W.R., Carvalho-Junior, A.E., Fernandes, T.D., and Yoshinari, H. H. 2002. Change in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. Joint bone Spine. 69: 189-194.

Montero, P., Alvarez, C., Marti, M.A., and Borderias, J. 1995. Placental skin collagen

extraction and functional properties. Journal of Food Science. 60: 1-3.

Sadowska, M., Kolodziejska, I., and Niecikowska, C. 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chemistry. (accepted, imprint).

Walter, R.J., Matsuda, T., Reyes, H. M., Walter, J. M. and Hanumadass, M. 1998. Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. Burns. 24: 104-113.

Wong, M., Hendrix, M.J., Mark, K. Little, C. and Stern, R. 1984. Collagen in the egg shell membranes of the hen. Journal of Developmental Biology. 104: 28-36.