Published online: 16 August 2019

การสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่

Extraction of Collagen from Eggshell Membrane

สิริกร ใจแสน

อีเมล์: 5951701290@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร. ณัตฐาวุฒิ ฐิติปราโมทย์ อาจารย์ที่ปรึกษา

อีเมล์: natthawut.thi@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่โดยสกัดด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่สภาวะแตกต่างกันของอัตราส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อตัวทำละลายเป็น 1:10 และ 1:20 และเวลาที่แตกต่างกัน 24 และ 48 ชั่วโมงพร้อมทั้งศึกษาลักษณะของคอลลาเจน และโปรตีนที่สกัดได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง, ความเข้มข้นโปรตีน และ ลักษณะของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ผลการศึกษาพบว่า การสกัดโดยใช้สัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ที่อัตราส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อตัวทำละลาย 1:20 ที่ 48 ชั่วโมง มีปริมาณร้อยละผลิตผลมากที่สุด (3.42±0.11%) และ อัตราส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อตัวทำละลาย 1:10 ที่ 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณร้อยละผลิตผลน้อยที่สุด (1.28±0.17%) จากผลการศึกษาลักษณะคอลลาเจน และ โปรตีนที่ได้ พบว่าสารสกัดคอลลาเจนทั้ง 4 สภาวะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (Maximum Absorbance) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 230 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโปรลีนที่พบในคอลลาเจน นอกจากนี้ในการสกัดคอลลาเจนดังกล่าว ยังพบโปรตีนอื่นรวมด้วยซึ่งมีมวลโมเลกุล 44-54 kDa ซึ่งอาจเป็นไกลโคโปรตีนในเปลือกไข่ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เยื่อเปลือกไข่ที่เป็นวัสดุเศษเหลือสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการสกัดคอลลาเจน และ ไกลโคโปรตีนได้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอื่นๆ

คำสำคัญ: การสกัด/ไกลโคโปรตีน/คอลลาเจน/โปรตีน/เยื่อเปลือกไข่/

Mae Fah Luang University

Abstract

This research was aimed to extract collagen from eggshell membrane by acid extraction (0.5 M acetic acid) using different ratio of eggshell membrane: solvent (1:10, and 1:20 w/w) and various extraction times (24, and 48 hours) and investigate the characteristics of collagen extracts by measuring maximum absorbance, total protein content, and protein characteristic using SDS-PAGE. The results showed that the collagen extracted with eggshell membrane: solvent ratio of 1:20 for 48 hours had the highest extractable yield (3.42±0.11% dry basis) and the lowest yield was from the extract using the ratio of 1:10 for 24 hours (1.28±0.17% dry basis). Moreover, all four collagen extracts had the maximum absorbance at 230 nm that is the absorbance of hydroxyproline amino acid in collagen. For SDS-PAGE result, all of extracts had other protein that showed the protein band at 44-54 kDa as glycoprotein in eggshell. The results suggested that eggshell might be used as alternative source of collagen and glycoprotein and these substances can be used as active ingredient in cosmetic and others.

Keywords: Collagen/Eggshell membrane/Extraction/Glycoprotein/Protein

บทนำ

ในแต่ละปีประเทศไทยมีกำลังการผลิตไข่ไก่อยู่ที่ 14915.82 ล้านฟองต่อปี มีปริมาณการบริโภคไข่ไก่ 14823.24 ล้านฟองต่อปี (สมาคมผู้ผลิต, ผู้ค้า และ ส่งออกไข่ไก่, 2559) โดยส่วนที่เหลือทิ้งคือส่วนเปลือกไข่ไก่ จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมามีรายงานว่าเปลือกไข่มีเยื่อเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก (ช้างเผือก, 2541) และ ภายในเยื่อของเปลือกไข่ไก่มีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบอยู่โดยประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของเยื่อเปลือกไข่ ภายในเยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วย Collagen type I, V , และ X ตามลำดับ (Balaz, 2014)

คอลลาเจนเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบอยู่ทั่วร่างกายของมนุษย์ ยกตัวอย่างเช่น คอลลาเจนในผิวหนัง ผิวหนังของมนุษย์มีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 3 ชั้น โดยชั้นที่มีคอลลาเจนอยู่คือชั้นที่ 2 หรือชั้นของผิวหนังแท้ (Dermis) โดยคอลลาเจนที่พบในชั้นผิวหนังแท้จะเป็น Collagen type I และ III อีกทั้งยังมี Collagen type VII จะกระจายอยู่ในบริเวณรอยต่อผิวหนังชั้นหนังแท้กับหนังกำพร้า (Epidermis) ซึ่งเรียกว่า Dermal-epidermal junction คอลลาเจนเป็นสารชนิดหนึ่งที่มีส่วนช่วยทำให้ผิวมีความนุ่ม อีกทั้งยังช่วยในเรื่องของการลดเลือนริ้วรอย แต่ทว่าคอลลาเจน เหล่านี้ก็มีการเสื่อมสภาพ โดยการเสื่อมสภาพนี้เกิดขึ้นจากสองปัจจัยหลักด้วยกัน คือ ปัจจัยภายในร่างกายอัน

Mae Fah Luang University

เนื่องมาจากกาลเวลาคอลลาเจนก็จะมีการเสื่อมสภาพและมีปริมาณลดลง และ ปัจจัยภายนอก ได้แก่ รังสี UV ในแสงแดดที่เป็นตัวกระตุ้นให้คอลลาเจนเกิดการเปลี่ยนแปลงและเสื่อมสภาพ

ในปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะค้นหาคอลลาเจนจากแหล่งอื่นมาทดแทนคอลลาเจนที่เกิดการเสื่อมสภาพตามกาลเวลา โดยแหล่งคอลลาเจนที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ คอลลาเจนจากวัวและหมู อย่างไรก็ตามคอลลาเจนจากแหล่งเหล่านี้นั้นยังมีข้อจำกัดในเรื่องของการติดต่อของโรคจากคนสู่สัตว์ เช่น โรคปากเท้าเปื่อย, โรควัวบ้า เป็นต้น หรือ จะเป็นในเรื่องของทางศาสนาที่ชาวมุสลิมผู้นับถือศาสนาอิสลามนั้นไม่สามารถบริโภคเนื้อหมูและใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของหมู เป็นต้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะหาคอลลาเจนจากแหล่งใหม่มาทดแทน เช่น คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลา แต่ด้วยเรื่องของราคาที่สูงมาก ทำให้ยังมีการหาคอลลาเจนจากแหล่งใหม่เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังมีการศึกษาวิจัยว่าเยื่อของเปลือกไข่มีความปลอดภัยและมีโอกาสน้อยที่จะเกิดการแพ้ได้ (Ruff, 2012) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ที่เหลือทิ้งจากการบริโภค

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการสกัดคอลลาเจนโดยใช้เยื่อเปลือกไข่เป็นวัตถุดิบในการสกัด

ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับการเตรียมคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ ทำการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ และ ทดสอบสมบัติการละลาย, ค่า pH รวมถึงลักษณะทางกายภาพของสารสกัด, ทดสอบสารสกัดจากเยื่อเปลือกไข่ โดยวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด รวมถึงหาความเข้มข้นของโปรตีนรวมในสารสกัดด้วยวิธี Bradford Protein Assay และ วิเคราะห์หาคอลลาเจนด้วย SDS-PAGE

Mae Fah Luang University

ทบทวนวรรณกรรม

ในชั้นของเยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วยเส้นใยโปรตีนเป็นหลักอยู่ประมาณ 80-85% มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 10% อีก 70-75% เป็นโปรตีนชนิดไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ lysine จากการวิจัยพบว่าในชั้นของเปลือกไข่และเยื่อเปลือกไข่มีโปรตีนอยู่มากกว่า 500 ชนิด โดยในแกนกลางของเยื่อเปลือกไข่ชั้นนอกมีส่วนประกอบของ Collagen type I เป็นหลัก ในขณะที่แกนกลางของเยื่อเปลือกไข่ชั้นในมี Collagen type I & V เป็นองค์ประกอบหลักส่วน Collagen type X นั้นพบอยู่ในทั้ง 2 ชั้นของเยื่อเปลือกไข่ (Balaz, 2014)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมเยื่อเปลือกไข่ นำเปลือกไข่ไก่เหลือใช้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด แล้วสะเด็ดน้ำให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที นำเปลือกไข่ไก่มาแช่ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วนของเปลือกไข่ไก่ต่อกรดอะซิติกเป็น 1:16 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลอกเยื่อออกแล้วนำมาล้างน้ำให้สะอาด และนำมาอบในตู้อบแห้ง จนแห้ง แล้วนำไปปั่นให้เป็นผงละเอียด
2. สกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ที่สภาวะต่ออัตราส่วนเยื่อเปลือกไข่:ตัวทำละลาย (1:10, 1:20 w/w) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง
3. ทดสอบสมบัติการละลายโดยทำการละลายสารสกัดในน้ำกลั่น และ กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์, ค่า pH รวมถึงลักษณะทางกายภาพของสารสกัด
4. นำสารสกัดที่ละลายในน้ำกลั่น และ กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ มาวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตั้งแต่ 200-700 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer
5. วิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford Protein Assay
6. วิเคราะห์สารสกัดด้วย SDS-PAGE เพื่อตรวจหา Collagen Type I ในสารสกัด

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการสกัดคอลลาเจนจากเยื่อเปลือกไข่ทั้ง 4 สภาวะ การสกัดโดยใช้สัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อัตราส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อตัวทำละลาย 1:20 ที่ 48 ชั่วโมง มีปริมาณร้อยละผลิตผลมากที่สุด (3.42±0.11%) และ อัตราส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อตัวทำละลาย 1: 10 ที่ 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณผลิตผลน้อยที่สุด (1.28±0.17%) ในส่วนของปริมาณผลิตผลที่ได้นั้น ปริมาณสัดส่วนและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มากนั้นจะได้ปริมาณผลิตผลร้อยละที่สูง ซึ่งเป็นไปตามความน่าจะเป็น

Mae Fah Luang University

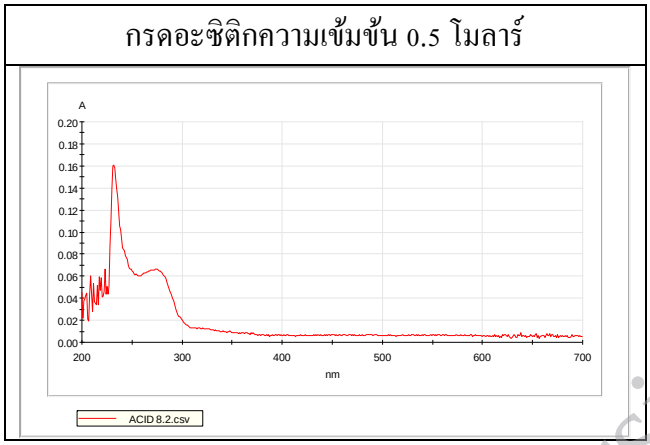
หลังจากละลายสารสกัดทั้ง 4 สภาวะในน้ำ และ ใน กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พบว่าสารสกัดละลายใน กรดอะซิติกแต่ไม่ละลายในน้ำ จากนั้นนำสารสกัดที่ละลายใน กรดอะซิติกไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร พบว่า ทั้ง 4 สภาวะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ซึ่งตรงกับค่าการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโปรลีน (Rizka Pantris et al., 2018) จากข้อมูลดังกล่าวจึงคาดว่าภายในสารสกัดมีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบ และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่สัดส่วน 1:20 มีค่ามากสุด โดยปริมาณสัดส่วนที่มากและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มากจะให้ปริมาณคอลลาเจน สูงสุดซึ่งเป็นไปตามความน่าจะเป็น

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตและลักษณะของสารสกัดคอลลาเจนและโปรตีนจากเยื่อเปลือกไข่

Ratio	Time (hours)	% Yield	Max Absorbance		Physical characteristics		
			λ max (nm)	Abs	Description	Solubility	pH
1:10	24	1.28±0.17[a]	236	0.070	ผงละเอียด สีน้ำตาล	ละลายใน 0.5M กรดอะซิติก ไม่ละลายในน้ำ	In Acid: 2.32 In DI: 5.42
1:10	48	1.34±0.25[a]	232	0.118	ผงละเอียด สีน้ำตาล	ละลายใน 0.5M Acetic acid ไม่ละลายในน้ำ	In Acid: 3.10 In DI: 6.09
1:20	24	2.29±0.39[b]	232	0.160	ผงละเอียด สีขาวอ่อน	ละลายใน 0.5M กรดอะซิติก ไม่ละลายในน้ำ	In Acid: 2.31 In DI: 6.03
1:20	48	3.42±0.11[c]	231	0.131	ผงละเอียด สีขาวอ่อน	ละลายใน 0.5M Acetic acid ไม่ละลายในน้ำ	In Acid: 2.30 In DI: 5.37

Mean±S.D. (n=3) ตัวอักษรยกที่แตกต่างกันแสดงถึงการแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ ANOVA Turkey test)

Mae Fah Luang University

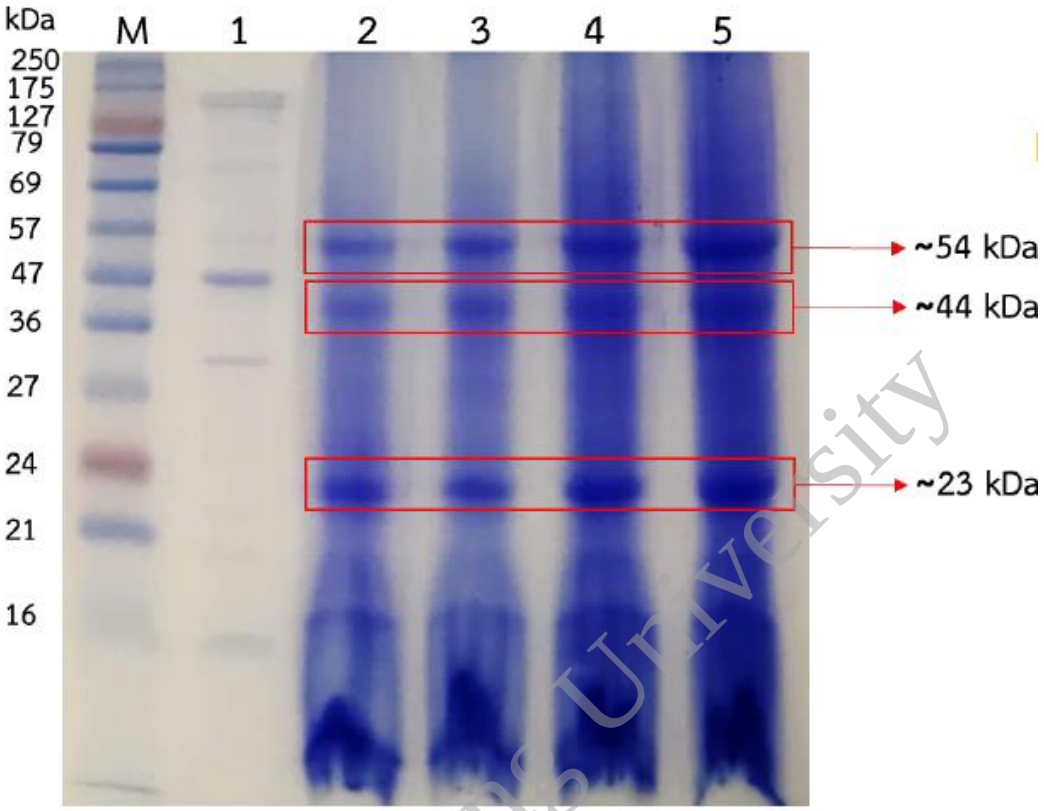


ภาพที่ 1 ลักษณะการดูดกลืนแสงของสารละลายคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรดอะซิติกที่อัตราส่วน 1:20 เวลา 24 ชั่วโมง โดยละลายด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้การสกัด ที่สัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อ กรดอะซิติกที่ 1:10 สกัดเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากในเยื่อเปลือกไข่ มีคอลลาเจน เป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 10% อีก 70-75% เป็นโปรตีนชนิด ไกลโคโปรตีน ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ lysine (Balaz, 2014) และ การวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford จะวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของ Arginine, lysine ได้ดี ทำให้คาดว่าในสารสกัดที่สัดส่วน 1:10 อาจมีปริมาณของไกลโคโปรตีนมากกว่าคอลลาเจน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด และการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

โดยปกติแถบมวลโมเลกุลของคอลลาเจน จะมีมวลโมเลกุลอยู่ที่ 116 kDa (Yu-Hong, & Yu-Jie 2009) จากผล SDS-PAGE ดังภาพที่ 2 แถบทั้ง 2 แถบมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 44-54 kDa ที่เหมือนกับ ไกลโคโปรตีน ทั้งนี้เนื่องจากในการเตรียมสารตัวอย่าง ได้ทำการละลายสารสกัดในน้ำกลั่นและดึงสารละลายที่มีตะกอนของสารสกัดปนอยู่ไปทำการวิเคราะห์ SDS-PAGE ทำให้ตรวจเจอแต่ ไกลโคโปรตีน ที่พบอยู่ในเยื่อเปลือกไข่ 70-75% (Balaz, 2014) อีกทั้งเมื่อเทียบเทียบจากความเข้มของสี ยิ่งมีความเข้มข้นมากสีก็จะยิ่งเข้ม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ใช้สัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ไก่ต่อ กรดอะซิติกที่สัดส่วน 1:10 สกัดเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของไกลโคโปรตีนมากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford

Mae Fah Luang University



ภาพที่ 2 SDS-PAGE ของสารสกัด 4 สภาวะเทียบกับสารมาตรฐาน Collagenase Type I

หมายเหตุ. M= Protein Marker 1=Collagenase Type I, 2=สัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ไก่ต่อ กรดอะซิติก 1:20, 24 hours 3=สัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ไก่ต่อ กรดอะซิติก 1:20, 48 hours. 4=สัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ไก่ต่อ กรดอะซิติก1:10, 24 hours 5=สัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ไก่ต่อ กรดอะซิติก1:10, 48 hours

สรุปผลการวิจัย

สารที่สกัดได้จากเยื่อเปลือกไข่ทั้ง 4 สภาวะ คือ คอลลาเจน จากการนำสารสกัดไปทำการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงพบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 230 nm ซึ่งตรงกับค่าการดูดกลืนแสงของคอลลาเจน และ เมื่อเปรียบเทียบวิธีสกัดของในแต่ละสภาวะพบว่า การสกัดที่มีสัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อ กรดอะซิติกเท่ากับ 1:20 สกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณผลิตผลมากที่สุดเท่ากับ 3.42±0.11% และ การสกัดที่มีสัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อ กรดอะซิติกที่ 1:10 สกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีปริมาณผลิตผลน้อยที่สุดเท่ากับ 1.28±0.17%

นอกจากนี้การศึกษาหาปริมาณโปรตีนพบ ไกลโคโปรตีน มากที่สภาวะสกัดที่มีสัดส่วนเยื่อเปลือกไข่ต่อ กรดอะซิติกที่สัดส่วน 1:10 สกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

Mae Fah Luang University

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ “สาลี่ เบเกอร์รี่” ผู้คอยร่วมรวมเปลือกไข่ไก่เหลือใช้จากการทำขนม ที่เป็นวัสดุสำคัญในการใช้เพื่อทำการสกัดคอลลาเจน และ ขอขอบพระคุณ อาจารย์, เจ้าหน้าที่ และบุคลากรของสำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาแม่ฟ้าหลวง ที่ให้ความช่วยเหลือคำแนะนำเพื่อให้การค้นคว้าอิสระนี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี

รายงานอ้างอิง

สมาคมผู้ผลิต, ผู้ค้า และ ส่งออกไข่ไก่. สถานการณ์ไข่ไก่ไทย. (2559). สืบค้าเมื่อ 22 พฤศจิกายน 2560 จาก http://www.egg-thailand.com/

อลงกต ช้างเผือก. (2541). การผลิตแคลเซียมคลอไรด์จากเปลือกไข่ไก่. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บัณฑิตวิทยาลัย.

Balaz, M. (2014). Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. *Acta Biomaterialia, 10*, 3827–3843

Rizka Pantris, R., Sri, W. & Widodo. (2018). UV Absorption Spectra of Collagen in the Presence of Plant Stability Agents. *The 9th International Conference on Global Resource Conservation (ICGRC) and AJI from Ritsumeikan University,* 020015-1–020015-4. doi: https://doi.org/10.1063/1.5061851

Ruff, K. J., Endres, J. R., Clewell, A. E., Szabo, J. R. & Schauss, A. G. (2012). Safety evaluation of a natural eggshell membrane-derived product. *Food and Chemical Toxicology, 50*, 604-611.

Yu-Hong, Z. & Yu-Jie, C. (2009). Characterization of collagen from eggshell membrane, *Biotechnology, 8(2)*, 254-258

Mae Fah Luang University